
**MASTITE BOVINA DA
STAPHYLOCOCCUS SPP.:
STUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* PER
L'APPLICAZIONE DI UN NUOVO
APPROCCIO TERAPEUTICO**

Dott.ssa Daniela Palumbo



Dottorato in Produzione e Sanità
degli Alimenti di Origine Animale - XX ciclo
Università degli Studi di Napoli Federico II

Dottorato in Produzione e Sanità
degli Alimenti di Origine Animale - XX ciclo
Università degli Studi di Napoli Federico II



**MASTITE BOVINA DA
STAPHYLOCOCCUS SPP.:
STUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* PER
L'APPLICAZIONE DI UN NUOVO
APPROCCIO TERAPEUTICO**

Dott.ssa Daniela Palumbo

Dottoranda: Dott.ssa Daniela Palumbo

Relatore: Prof. Domenico Iannelli

Coordinatore: Prof.ssa Maria Luisa Cortesi

INDICE

RIASSUNTO	1
1. INTRODUZIONE	3
1.1. LA MASTITE	3
1.1.1. Gli agenti patogeni della mastite	3
1.1.2. La mastite e il sistema immunitario	4
1.1.3. Importanza economica della mastite	5
1.1.4. Diagnosi e prevenzione della mastite	5
1.1.5. Trattamento della mastite e problema dell'antibiotico resistenza	6
1.1.6. Nuove prospettive di profilassi e terapia	3
1.2. I PEPTIDI ANTIMICROBICI	10
1.2.1. Caratteristiche generali dei peptidi antimicrobici	10
1.2.2. Peptidi e proteine come fattori dell'immunità innata	10
1.2.3. Meccanismo d'azione dei peptidi antimicrobici	12
1.2.4. Classificazione dei peptidi antimicrobici	Errore. Il segnalibro non è definito.
1.2.5. Defensine	14
1.2.6. Le puroindoline	15
1.2.7. Le puroindoline come agenti antimicrobici	16
1.3. APPLICAZIONI DELLE PROTEINE AD ATTIVITA' ANTIMICROBICA	17
1.4. L'AIUTO DELLE BIOTECNOLOGIE	18
1.5. SCOPO DELLA TESI	20
2. MATERIALI E METODI	21
2.1. Materiali	21
2.1.1. Prodotti da forno	21
2.1.2. Colture batteriche	21
2.2. Produzione di anticorpi	21
2.3. Purificazione degli anticorpi	22
2.4. Estrazione delle proteine totali	22
2.5. Immunoassorbente	22
2.5.1. Formazione del legame covalente particelle-anticorpo	23
2.5.2. Formazione del legame anticorpo-antigene	23
2.5.3. Rottura del legame anticorpo-antigene e recupero dell'antigene	23
2.6. Test citofluorimetrico	23
2.7. Microscopia a immunofluorescenza	24
2.8. Estrazione del DNA genomico	24
2.9. Sistemi di espressione	25
2.10. Clonaggio nel vettore pET100 dei geni <i>pina</i> e <i>pinb</i> (Hys-PINA, Hys-PINB) ..	25
2.11. Clonaggio nel vettore pGEX dei geni <i>pina</i> e <i>pinb</i> (GST-PINA, GST-PINB)...	26
2.12. Purificazione di frammenti di DNA da gel di agarosio	26
2.13. Digestione di DNA con enzimi di restrizione	27
2.14. Reazioni di ligazione	27
2.15. Trasformazione con il vettore pET100:PIN	27
2.16. Trasformazione con il vettore pGEX:PIN	28
2.17. Estrazione del DNA plasmidico	28
2.18. Espressione delle Hys-PIN e delle GST-PIN	29

2.18.1.	Preinoculo	29
2.18.2.	Inoculo ed induzione	29
2.18.3.	Cinetica di accumulo della proteina eterologa	29
2.19.	Estrazione delle proteine solubili ed insolubili	30
2.20.	Purificazione e analisi delle Hys-PIN.....	30
2.21.	Purificazione e analisi delle GST-PIN.....	30
2.22.	Procedura di refolding e taglio del tag	31
2.23.	Produzione di anticorpi contro le PIN ricombinanti (rPIN)	31
2.24.	SDS-PAGE.....	31
2.25.	Western Blotting.....	32
2.26.	Test di attività antimicrobica	32
2.27.	Conta in piastra	33
2.28.	Analisi della vitalità batterica mediante microscopia a fluorescenza	33
2.29.	Analisi della vitalità batterica mediante citofluorimetria	33
2.30.	Saggio di attività emolitica delle rPIN	34
2.31.	Saggio di induzione di accumulo di nitriti su linee cellulari di macrofagi trattati con le rPIN.....	34
2.32.	Esperimenti di infezione <i>in vitro</i> con <i>S. epidermidis</i> e analisi della vitalità dei batteri intracellulari dopo il trattamento con le rPIN	34
2.33.	Esperimenti di infezione <i>in vivo</i> con <i>S. aureus</i> e analisi dell'infezione dopo il trattamento con le rPIN.....	34
2.34.	Misura dell'espressione delle citochine a seguito del trattamento con le rPIN di topi infetti con <i>S. aureus</i>	34
2.35.	Analisi degli antigeni delle cellule T	34
2.36.	Misura dell'infiammazione	34
2.37.	Analisi statistica.....	34
3.	RISULTATI	37
3.1.	Immunolocalizzazione di PINA e PINB nella cariossida	37
3.2.	Identificazione delle puroindoline nelle preparazioni industriali	37
3.3.	Attività antibatterica delle puroindoline native	38
3.4.	Espressione di Hys-PINA ed Hys-PINB nelle cellule pLysS e BL21*	39
3.5.	Espressione di GST-PINA e GST-PINB nelle cellule DH5 α	39
3.6.	Identità e purezza delle proteine ricombinanti purificate.....	40
3.7.	Refolding delle puroindoline ricombinanti e taglio del tag.....	40
3.8.	Le rPIN inducono in ratto la produzione di anticorpi in grado di riconoscere le puroindoline native	41
3.9.	Attività antibatterica delle rPIN	41
3.10.	Espressione di GST-PINA e GST-PINB nel ceppo ORIGAMI TM B e purificazione di ORIA e ORIB.....	41
3.11.	Taglio della GST e caratterizzazione di ORIA ed ORIB	42
3.12.	Proprietà antimicrobiche ed emolitiche di ORIA ed ORIB	42
3.13.	Analisi dell'attività antimicrobica mediante microscopia a fluorescenza	42
3.14.	Analisi dell'attività antimicrobica mediante citofluorimetria	42
3.15.	Induzione di accumulo di nitriti da parte di ORIA ed ORIB in macrofagi in coltura	43
3.16.	Infezione <i>in vitro</i> delle J774 con <i>S. epidermidis</i> e analisi della vitalità dei batteri intracellulari dopo il trattamento con ORIA ed ORIB	43
3.17.	Infezione <i>in vivo</i> di topi con <i>S. aureus</i> e analisi dell'infezione dopo il trattamento con le rPIN	43
3.17.1.	Il pretrattamento dei topi con le rPIN inibisce la crescita batterica	43

3.17.2. Il pretrattamento dei topi con le rPIN inibisce l'infiammazione	43
3.17.3. Attività terapeutica delle rPIN	43
4. DISCUSSIONE	45
5. BIBLIOGRAFIA	50
6. TABELLE.....	57
7. FIGURE	66

RIASSUNTO

Nella pratica della agricoltura, l'allevamento degli animali da carne e da latte dipende fortemente dall'uso di composti farmacologicamente attivi. L'uso di sostanze in animali è fondamentale per la salute dell'animale stesso e per l'economia dell'azienda zootecnica. Gli antibiotici rappresentano una classe di sostanze comunemente utilizzate nell'allevamento, dove svolgono l'importante ruolo di controllare le infezioni batteriche, tra cui quelle causate dallo *Staphylococcus aureus* e dallo *Staphylococcus epidermidis*, agenti patogeni della mastite. I benefici nell'uso degli antibiotici in allevamento derivano dal mantenimento del buono stato di salute degli animali e, perciò, dalla ridotta possibilità che la malattia possa estendersi dall'animale all'uomo. Tuttavia, residui di antibiotici usati nella produzione di animali da carne e da latte possono entrare nella catena alimentare umana aumentando il rischio per la salute dei consumatori, a causa degli effetti allergici o comunque nocivi che tali sostanze possono avere. Inoltre, residui di antibiotici trasferiti all'uomo dagli alimenti possono contribuire alla selezione di batteri resistenti nell'individuo che ha consumato l'alimento contaminato. Di conseguenza la ricerca di sostanze di origine naturale che possano sostituire gli antibiotici comunemente utilizzati diventa di enorme importanza, soprattutto in relazione alla domanda crescente dei consumatori per alimenti sani, sicuri e naturali.

In questo contesto s'inserisce con successo una nuova classe di proteine che mostrano attività antimicrobica. Queste proteine sono caratterizzate da un basso peso molecolare, da una struttura globulare contenente ponti disolfuro e da un dominio ricco di triptofano che conferisce loro una forte affinità a legare i lipidi polari, di cui sono costituite le membrane microbiche. Le proteine ad attività antimicrobica mostrano un ampio spettro d'attività contro patogeni antibiotico-resistenti e d'importanza clinica.

Il presente lavoro di tesi prende in considerazione due polipeptidi del frumento tenero, indicati come puroindolina a (PINA) e puroindolina b (PINB), che, oltre ad essere importanti dal punto di vista tecnologico determinando il carattere "hardness", mostrano un'interessante attività antimicrobica.

E' stata studiata per la prima volta la distribuzione e la localizzazione dei due polipeptidi nelle cariossidi mature. Con l'aiuto di anticorpi policlonali specifici per ognuna delle due puroindoline è stato possibile correlare la loro localizzazione con il ruolo che esse svolgono nella cariosside. In particolare, è stato osservato che PINA e PINB non solo hanno la stessa distribuzione spaziale nella cariosside di frumento tenero, ma sono sempre co-localizzate. La loro contemporanea presenza in alcuni compartimenti della cariosside di frumento, ha fatto pensare ad una loro eventuale azione sinergica. Test preliminari di attività antimicrobica condotti *in vitro* su cellule batteriche, hanno permesso di valutare l'azione delle puroindoline da sole o in combinazione e di ipotizzare un possibile meccanismo d'azione.

L'evidenza della loro attività antimicrobica e la loro naturale presenza nel frumento tenero candida le puroindoline come promettenti agenti antibatterici. Date le difficoltà di purificazione dei due singoli polipeptidi a partire dal frumento, sono state studiate diverse strategie di clonaggio per ottenere puroindoline ricombinanti biologicamente attive in elevate quantità. I risultati migliori sono stati ottenuti clonando separatamente i geni delle puroindoline nel ceppo di espressione ORIGAMI B di *Escherichia coli*, ingegnerizzato appositamente per favorire la corretta formazione dei ponti disolfuro delle proteine ricombinanti nel citoplasma. Con questo sistema di

espressione le puroindoline ricombinanti (rPINA e rPINB) sono state purificate dalla frazione solubile in forma funzionale.

Allo scopo di utilizzare le puroindoline per il controllo della mastite, entrambe le proteine ricombinanti sono state testate *in vitro* su *S. aureus* e *S. epidermidis*. I risultati ottenuti hanno evidenziato che, alla concentrazione di 30 µg/ml, entrambe le proteine, testate individualmente, sono capaci di inibire del 100% la crescita di *S. aureus* e del 90% la crescita di *S. epidermidis*. A più alte concentrazioni – rPINA 125 µg/ml e rPINB 40 µg/ml – le stesse proteine determinano la morte del 100% dei batteri anche in *S. epidermidis*. Inoltre, quando testate *in vitro* su colture cellulari di macrofagi murini, rPINA e rPINB non hanno mostrato una evidente tossicità e sono capaci di uccidere i batteri intracellulari. rPINA e rPINB sono state testate anche in combinazione e i risultati ottenuti sono del tutto paragonabili a quanto osservato per le analoghe forme native.

Per determinare il possibile utilizzo delle puroindoline nelle procedure di profilassi o nel trattamento delle infezioni mastitiche da *S. aureus*, ulteriori indagini sulle loro proprietà farmacologiche sono state condotte effettuando test *in vivo* su modelli animali. Tali esperimenti hanno permesso di studiare l'attività antimicrobica di queste due proteine ed un loro eventuale sinergismo. I risultati hanno mostrato che i due polipeptidi sono in grado di inibire *in vivo* la crescita di *S. aureus* e che, quando combinati, sono in grado di aumentare la loro percentuale di inibizione, mostrando una tossicità più elevata. Inoltre, rPINA e rPINB non si sono rivelate tossiche per gli animali e questo, unito alle loro capacità di inibire la crescita batterica, candida le puroindoline come promettenti agenti antibatterici.

1. INTRODUZIONE

1.1. LA MASTITE

La mastite è un'infezione della ghiandola mammaria, causata solitamente da un'infezione batterica. Essa conduce ad una riduzione della produzione di latte e ad un'alterazione della sua composizione, che ne insidia la qualità, sia come prodotto di consumo immediato che come materia prima per la produzione di latticini (Fitzpatrick et al., 2000). Inoltre, il costo di produzione del latte aumenta per il costo supplementare del trattamento antibiotico a cui gli animali sono sottoposti (Spranger 2000).

1.1.1. Gli agenti patogeni della mastite

L'infezione mastitica può essere causata da batteri, funghi e lieviti. Tuttavia, le cause patologiche più comuni di mastite sono attribuibili a batteri, quali: *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ed *Escherichia coli*. Tali microrganismi penetrano nella mammella dell'animale a livello della parte interna della ghiandola e del setto mammario nel padiglione latteo (Nagahata et al., 2007).

I casi di mastite sono distinti in mastite clinica, caratterizzata dalla comparsa dei sintomi clinici (rigonfiamento della mammella, iperemia, aumento della temperatura corporea, perdita di appetito, dolore e, in alcuni casi, morte), che possono notare gli stessi allevatori e subclinica, per la quale non vi sono sintomi manifesti ma che si può rilevare solo dopo prove di laboratorio. Il latte degli animali colpiti da mastite clinica mostra alterazioni nella forma e nella composizione chimica e contiene moltissimi microrganismi patogeni, globuli bianchi e, nei casi più gravi, tracce di sangue. Questo latte è inadatto per qualunque utilizzo. Gli animali con sintomi subclinici di mastite producono poco latte, il quale ha una composizione chimica per la produzione di formaggio di bassa qualità, principalmente per modifiche nella proporzione dei diversi contenuti proteici (Fitzpatrick et al., 2000).

Le forme più comuni di mastite sono quelle causate da *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*. La mastite dovuta a questi due batteri è trasmessa con la mungitura da un animale all'altro, se non vengono seguite le disposizioni igieniche di base, che prevedono la pulizia della mammella prima e dopo ogni mungitura, così come la pulizia delle mungitrici e delle mani degli operatori. Solitamente, questi agenti patogeni causano infezioni croniche che compaiono inizialmente come mastite subclinica e poi, in determinati casi, si trasformano in cliniche. La mastite clinica è solitamente trattata mediante iniezione dell'antibiotico adatto nella mammella; la maggior parte delle infezioni da *Streptococcus agalactiae* sono trattabili, al contrario di quelle da *Staphylococcus aureus*, che sono più difficili da trattare. Le infezioni da *Streptococcus uberis* ed *Escherichia coli* solitamente sono dette "ambientali" poiché questi agenti patogeni sono principalmente trasmessi dall'ambiente all'animale e spesso dalla lettiera. Si sviluppano solitamente in mastite clinica. L'infezione con lo *Streptococcus uberis* è trattata facilmente con gli antibiotici, al contrario di quella dovuta ad *Escherichia coli*.

Tra le mastiti, quelle subcliniche sono quelle di maggior interesse perché si trovano in tutti gli allevamenti, infettano le vacche e dipendono direttamente dalle circostanze della stalla. La loro completa eliminazione non è sempre possibile, il loro contenimento, tuttavia, a bassi livelli può essere realizzato ponendo attenzione all'igiene degli animali e della stalla, e con l'uso di antibiotici adeguati.

1.1.2. La mastite e il sistema immunitario

Le principali cause predisponenti la mastite sono di natura ambientale ed individuale (soprattutto le difese immunitarie). Tuttavia, come precedentemente detto, tale patologia trova nei batteri la causa necessaria. Quando i microrganismi penetrano nella mammella attraverso il canale del capezzolo e si moltiplicano nel latte, si scatena un processo di natura infiammatoria che può avere un effetto diretto sull'epitelio mammario e sulle cellule presenti nel latte. Nel tessuto mammario e nel latte, infatti, si trovano cellule di natura immunitaria che svolgono un importante ruolo difensivo per la mammella. Si tratta di leucociti, appartenenti alla serie bianca, quali macrofagi, linfociti e neutrofili polimorfonucleati.

I neutrofili sono cellule specializzate nel fagocitare e distruggere il microrganismo patogeno tramite reazioni chimiche che lo inglobano nella cellula. Queste cellule svolgono un ruolo chiave nel combattere l'infezione, e vengono richiamate in gran numero nel latte dal sangue, nel caso di un'invasione batterica della mammella.

I macrofagi sono grosse cellule che hanno il compito di dirigersi per prime verso i batteri, attaccarli e fagocitarli favorendo così il riconoscimento dei suoi antigeni da parte dei linfociti. Inoltre sono in grado, una volta venute a contatto col microrganismo invasore, di produrre sostanze (chiamate citochine) che sono importanti mediatori dell'infiammazione e possono essere direttamente coinvolte nell'insorgenza della malattia.

I linfociti B e T giocano un ruolo chiave nelle reazioni immunitarie specifiche che seguono la risposta iniziale all'infezione. In particolare, i linfociti B sono le cellule che, una volta riconosciuto il microrganismo presentato dal macrofago, iniziano la produzione di anticorpi specifici verso il patogeno, mentre i linfociti T sono coinvolti nell'immunità cellulomediata. Anche queste cellule sono in grado di rilasciare citochine, importanti nello scatenamento di una risposta immunitaria equilibrata nei confronti del patogeno invasore (Merle et al., 2007).

Nel latte di un animale sano le cellule epiteliali si trovano in bassa percentuale (0-7%), i macrofagi predominano fino a raggiungere anche il 60% della popolazione cellulare, i linfociti si trovano circa al 30% (con predominanza dei linfociti T sui linfociti B), mentre i neutrofili presenti sono circa il 10% delle cellule. Quando il patogeno arriva nella mammella, tutte le cellule residenti agiscono in maniera organizzata per eliminare l'intruso e, mentre i macrofagi iniziano a inglobare il microrganismo, si avvia l'elaborazione di citochine che porta alla fuoriuscita dei neutrofili dal sangue verso il latte, dove svolgeranno un ruolo chiave nel processo infiammatorio: la velocità del loro afflusso appare infatti un passaggio essenziale per la risoluzione dell'infiammazione. Così, nel latte di un animale con mastite vi sarà un'elevata percentuale di neutrofili che diventano la popolazione cellulare dominante, rappresentando fino al 90% delle cellule presenti nelle prime fasi dell'infezione (Lahouassa et al., 2007) (Figura 1).

Il termine «cellule somatiche» venne elaborato da Prescott e Breed nel 1910, quando si pensava ancora che il rialzo di cellule che si osserva nel latte di un animale con

mastite fosse causato da un superiore sfaldamento delle cellule epiteliali che si staccavano dagli alveoli mammari. Oggi le cellule somatiche si chiamano ancora così per indicare le componenti cellulari del latte, che subiscono un notevole aumento in caso di mastite, nonostante sia stato dimostrato che si tratta prevalentemente di neutrofili provenienti dal sangue. L'infezione mammaria provoca dunque un afflusso di leucociti dal sangue, a cui si affianca l'alterazione della funzionalità secretoria delle cellule mammarie e il conseguente cambiamento nel volume e nella composizione del latte, di cui le cellule somatiche sono un fedele indice. Per questo motivo le cellule somatiche sono accettate dal mondo scientifico internazionale come standard di qualità del latte prodotto (Barkema et al., 1998).

1.1.3. Importanza economica della mastite

La mastite rappresenta, dal punto di vista finanziario, un problema molto grave per l'impresa zootecnica, sia direttamente, per la riduzione del latte prodotto, per la perdita di animali e a causa del costo supplementare degli antibiotici richiesti per il trattamento, che indirettamente, per il peggioramento nella qualità del latte, che non può essere più utilizzato per la preparazione dei latticini (Spranger, 2000).

1.1.4. Diagnosi e prevenzione della mastite

Un miglioramento quali-quantitativo delle produzioni lattiero-casearie necessita, in primo luogo, di un'accurata indagine preventiva. Tuttavia, allo stato attuale gli strumenti diagnostici utilizzati non sono adeguati alla diagnosi precoce (Bramley et al., 1996). Il problema è maggiormente sentito in caso di mastiti subcliniche che, molto spesso, sono riconosciute solo quando il danno economico è ormai irreversibile. La possibilità di affiancare ai tradizionali metodi microbiologici strumenti diagnostici innovativi, in grado di identificare in modo rapido, economico ed efficace i capi affetti da mastiti subcliniche (e quindi di valutare lo stato sanitario degli animali in allevamento) e nello stesso tempo di riconoscere nel latte i patogeni responsabili dell'infezione, faciliterebbe la prevenzione e la cura delle mastiti e garantirebbe allo stesso tempo un miglioramento quali-quantitativo delle produzioni. Strumenti di questo tipo sono la valutazione dello stato metabolico e sanitario della bovina mediante analisi ematochimiche e biochimico-cliniche, con la quantificazione della concentrazione nel sangue e nel latte di alcune proteine di fase acuta; al contempo, è in corso di realizzazione un software per l'analisi statistica su larga scala dei dati raccolti di routine sulla concentrazione delle cellule somatiche sia in presenza che in assenza dei dati riguardanti le infezioni.

Negli ultimi anni, inoltre, sono stati individuati geni che conferiscono resistenza all'infezione (Kulberg et al, 2007) il cui studio potrebbe essere efficacemente usato per la selezione degli animali da allevamento. Le difese principali della mammella sono di tipo strutturale e immunitario. Quest'ultimo è misurabile attraverso la conta delle cellule somatiche presenti nel latte. È stato dimostrato che la conta delle cellule somatiche è un buon indicatore della presenza di mastiti sia cliniche che subcliniche (Sharma et al., 2006). A livello genetico è stata calcolata una correlazione tra mastiti cliniche e conta delle cellule somatiche fino all'89%. Questo valore indica che all'aumentare del contenuto delle cellule somatiche nel latte aumenta la suscettibilità alle mastiti cliniche e che questo legame, dato l'elevato valore di correlazione, è

molto stretto. Per confermare questo dato, è stata inoltre calcolata una correlazione genetica tra conta cellulare e infezioni batteriche che, in alcuni casi, raggiunge addirittura il 99%, indicando un legame ancora più elevato tra infezione e presenza di cellule. Lo stretto legame genetico esistente tra questi caratteri indica, probabilmente, che la presenza di cellule nel latte e la resistenza alle mastiti sono controllati dallo stesso gruppo di geni. Selezionare per una minore conta cellulare significa pertanto selezionare per una minore suscettibilità alla mastite (Sharma et al., 2006). Inoltre, la possibilità di eseguire selezione genetica per bassa incidenza di mastite è stata dimostrata individuando un altro marcatore: la ridotta concentrazione di leucociti polimorfonucleati neutrofili (PMN) nel sangue, specie prima del parto (Kulberg et al., 2002). Tuttavia, la selezione diretta per la resistenza alle mastiti presuppone la raccolta costante di dati per questa patologia. Purtroppo gli unici Paesi in cui si registrano ufficialmente tutti i trattamenti sanitari a cui sono sottoposte le vacche sono i Paesi Scandinavi. Negli altri stati, Italia compresa, non vengono raccolti questi tipi di dati a livello nazionale e in modo sufficientemente diffuso da permettere la valutazione genetica per questo carattere.

Nel settore dei bovini da latte è stato rilevato che la risposta infiammatoria della ghiandola mammaria all'invasione batterica si traduce in danni irreversibili dell'epitelio ghiandolare con conseguente riduzione permanente della produttività; per minimizzare il danno, uno degli strumenti a disposizione è la modulazione del sistema immunitario (Bruckmaier, 2005). Molti ricercatori hanno cercato di individuare i mediatori di questa risposta infiammatoria, per sviluppare nuove strategie di terapia e prevenzione; in questo ambito, l'ossido nitrico (NO) gioca un ruolo importante e viene ritenuto, attraverso i suoi metaboliti, la maggior causa di danno al tessuto ghiandolare mammario (Boulanger et al., 2007). La produzione di NO dipende dall'enzima NO sintetasi (NOS), la cui isoforma inducibile (iNOS) è responsabile della superproduzione di NO in alcune patologie infiammatorie umane e murine; nel bovino, quest'ultima è stata dimostrata nei macrofagi, mentre sono ancora poche le informazioni riguardo alla sua presenza nei polimorfonucleati neutrofili, predominanti nel latte mastitico. Non è ancora possibile sapere se l'NO sia prodotto specificatamente in corso di mastite oppure possa essere considerato semplicemente un fattore causale del danno cellulare; tuttavia, esso rappresenta un importante oggetto di studio (Boulanger et al., 2007).

1.1.5. Trattamento della mastite e problema dell'antibiotico resistenza

La terapia delle mastiti prevede l'uso di composti farmacologicamente attivi, in prevalenza antibiotici, con una percentuale di successo compresa tra il 20 ed il 90%, a seconda del tipo e dello stadio dell'infiammazione. Gli antibiotici sono farmaci fondamentali per il controllo delle malattie infettive dell'uomo e degli animali. Hanno inoltre contribuito al miglioramento delle produzioni zootecniche: controllando le infezioni batteriche, essi permettono il mantenimento del buono stato di salute degli animali e, al contempo, riducono la possibilità che la malattia possa estendersi dall'animale all'uomo.

Tuttavia, residui di antibiotici usati nella produzione di animali da carne e/o latte possono entrare nella catena alimentare umana aumentando il rischio per la salute dei consumatori, a causa di effetti allergici o comunque nocivi che tali sostanze possono avere. Inoltre, residui di antibiotici trasferiti all'uomo dagli alimenti possono contribuire alla selezione di batteri resistenti nell'individuo che ha consumato

l'alimento contaminato. Negli ultimi anni, infatti, si è assistito all'emergenza e alla diffusione di fenomeni di antibiotico-resistenza, con possibili rischi per la salute pubblica (Busani et al., 2003). In particolare, gli antibiotici attualmente impiegati per la cura della mastite destano fondate preoccupazioni di sanità pubblica in relazione all'emergere nel bovino di ceppi di *Salmonella* pluri-resistenti, patogeni per l'uomo (Fey et al., 2000).

La resistenza dei microrganismi agli antibiotici è attualmente considerata, a livello mondiale, come uno dei principali problemi della sanità pubblica, e coinvolge in modo equivalente la medicina umana e la medicina veterinaria. E' stato ampiamente dimostrato come l'utilizzo di antibiotici negli animali porti alla selezione di ceppi resistenti che hanno la possibilità di colonizzare l'intestino e, conseguentemente, di essere escreti e di contaminare l'ambiente e gli alimenti derivati (Ricci et al., 2003). Questo comporta una duplice possibilità di interazione animale-uomo: da un lato, qualora i microrganismi resistenti siano agenti di zoonosi (ad esempio, *Salmonelle* e *Campylobacter*), questi sono in grado di causare infezione nell'uomo e ovviamente di veicolare a quest'ultimo la propria resistenza, ma è altrettanto vero che anche batteri non patogeni per l'uomo subiscono nell'intestino dell'animale la stessa pressione selettiva a cui sono sottoposti i batteri "target" della terapia antibiotica e possono acquisire o esprimere determinanti genetici di resistenza che possono essere trasmessi a microrganismi diversi, anche spiccatamente patogeni. In un recente lavoro (Van den Bogaard e Stobberingh, 2000) sono stati testati per quanto riguarda l'antibiotico-resistenza ceppi di *E. coli* ed enterococchi isolati da contenuto intestinale di bovini regolarmente macellati nell'ambito del territorio regionale del Veneto. Per entrambi i microrganismi, i livelli più elevati di resistenza si sono evidenziati nei ceppi isolati da vitelli a carne bianca, il che è sicuramente da mettere in relazione con il massiccio uso di sostanze ad azione antimicrobica in questa categoria di animali. In particolare, in *E. coli* sono da notare gli elevati livelli di resistenza al sulfametoxazolo/trimethoprim (58,3%), al cloramfenicolo (30,6%), e ai fluorochinoloni (16,7% all'enrofloxacin). Non sono state rilevate resistenze nei confronti delle cefalosporine. Per quanto riguarda gli enterococchi, batteri commensali ma talvolta agenti responsabili di importanti infezioni nosocomiali, si è evidenziata nei vitelli elevata resistenza all'eritromicina (88,5%) e alla spiramicina (96,2%), bassi livelli di resistenza ad ampicillina e gentamicina (< 10%), mentre il 26,9% e il 7,7% sono resistenti rispettivamente a vancomicina e teicoplanina. Queste ultime due resistenze assumono peraltro carattere di notevole gravità, in quanto sono verso antibiotici particolarmente importanti nel trattamento di infezioni da enterococchi multiresistenti nell'uomo, al punto che l'evidenza di fenomeni di resistenza alla vancomicina in batteri di origine animale ha portato nel 1997 al bando, a livello comunitario, dell'avoparcina (analogo della vancomicina) come promotore di crescita negli animali (Direttiva 97/72/CE della Commissione del 15 dicembre 1997).

Questi risultati sono particolarmente interessanti e portano a sottolineare la necessità sia di istituire piani di monitoraggio dell'antibiotico-resistenza a livello nazionale, sia di promuovere l'applicazione di pratiche di uso prudente degli antibiotici nel settore zootecnico. Sarebbe interessante, inoltre, trovare alternative naturali agli antibiotici comunemente utilizzati, che consentano di ottenere un alto grado di sicurezza contro i microrganismi patogeni per gli animali da allevamento e che, al contempo, permettano di aumentare la sicurezza degli alimenti destinati al consumo umano (Schukken et al., 1998; Philpot, 2002).

1.1.6. Nuove prospettive di profilassi e terapia

Il problema della antibiotico-resistenza potrebbe portare, fra qualche anno, ad una notevole restrizione nell'uso di tali composti farmacologici, con le inevitabili ripercussioni per gli operatori del settore. Tale assunto rende urgente in primo luogo ampliare gli interventi di profilassi basati sul management, sull'igiene zootecnica ed il rispetto del benessere animale. A fianco di questi interventi è ragionevole presupporre uno sviluppo di rimedi naturali che possano sostituire quelli attualmente in uso.

Negli ultimi anni sono stati introdotti nuovi interventi di immunomodulazione mirata con prodotti biologici o di sintesi. Due sono i capisaldi di questi interventi: il ripristino della competenza immunitaria nei confronti dei microrganismi patogeni ambientali ed il controllo della cascata di fenomeni infiammatori abnormi indotti dall'esposizione a tali microrganismi. Ad esempio, si è cercato di aumentare la capacità funzionale dei PMN e la concentrazione in mammella di anticorpi opsonizzanti. L'obiettivo è stato perseguito con la somministrazione locale delle citochine implicate nell'induzione e differenziazione della risposta immunitaria, in particolare interleuchina-2 (IL-2) e interleuchina-1 β (IL-1 β). IL-2 associata ad una cefalosporina di prima generazione ha determinato un cospicuo aumento dei quarti mammari risanati da *S. aureus*, rispetto alle bovine trattate con il solo antibiotico; purtroppo, il trattamento previsto (40.000.000 U.I. circa) ha rivelato un certo effetto abortigeno (Erskine et al., 1997). Su quarti sani non infetti, IL-2 provoca effetti locali a dosaggi molto più ridotti (Sordillo et al., 1991). Su quarti in lattazione infetti da *S. aureus*, dosaggi molto elevati di IL-2 possono eliminare l'infezione in una buona percentuale di quarti trattati (Daley et al., 1991). In associazione all'antibiotico, già 6-20 milioni di unità possono potenziare di molto gli effetti terapeutici in lattazione (del 20-30% circa) (Daley et al., 1992). Bovine trattate con gamma-interferon, inoltre, hanno mostrato forte resistenza all'infezione sperimentale con *E. coli*, rispetto a quelle di controllo non trattate (Sordillo e Babiuk, 1991). Oltre al gamma-interferon, anche l'alfa-interferon potrebbe essere di una certa utilità in relazione alla sua capacità di intervenire sul ripristino di funzioni immunitarie, di controllare patologie infiammatorie di tipo cronico anche autoimmuni e di poter agire per somministrazione orale a bassi dosaggi (Tompkins, 1999). Affinché l'impiego degli immunomodulatori sia efficace, è necessario intervenire in forma mirata, scegliendo con cura la fase più idonea del ciclo zootecnico per l'intervento. Nel caso della mastite bovina la fase più a rischio è il parto e la fase precoce di lattazione, in cui la possibilità di contrarre nuove infezioni mammarie è massima.

Un'altra possibile alternativa all'uso degli antibiotici per la cura della mastite è rappresentata dall'omeopatia. La somministrazione dei rimedi omeopatici offre diversi vantaggi e, pertanto, negli ultimi anni lo sforzo dei veterinari di educarsi nel campo dell'omeopatia per la consulenza sugli animali è in costante aumento. Questa pratica, infatti, permette di trattare gli animali anche durante la lattazione, è economica, non determina comparsa di batteri resistenti, non da controindicazioni o interazione con altri farmaci, non ha effetti collaterali e residui di farmaci omeopatici non sono mai stati riscontrati negli alimenti derivati da animali trattati. Tuttavia, ci sono pochi studi scientificamente fondati sugli effetti e l'efficacia dei prodotti omeopatici nel trattamento delle mastiti, perciò un giudizio sulla loro validità secondo criteri scientificamente riconosciuti è quasi impossibile. Inoltre le condizioni generali (ad esempio tipo e stadio della mastite, agente patogeno e stato di salute dell'animale), che potrebbero spiegare il successo o l'insuccesso del trattamento, il più delle volte restano sconosciuti o non vengono citati. Analogamente, la qualità dei

rimedi spesso non è conosciuta, così come i fattori che ne causerebbero la riduzione (Andersson e Leon, 1999).

Anche la biologia molecolare potrebbe rappresentare una valida strategia per il controllo delle infezioni mastitiche da *Staphylococcus Spp.* E' stato dimostrato, ad esempio, che è possibile eseguire selezione genetica per bassa incidenza di mastite; tra i possibili marcatori di queste bovine va segnalata la ridotta concentrazione di PMN nel sangue, specie prima del parto (Kulberg S. et al., 2002). Sebbene questo potrebbe sembrare una valida e promettente alternativa per la risoluzione del problema mastite, essa si scontra con la scetticità degli allevatori e soprattutto con le grosse difficoltà che un programma di selezione comporta in termini di gestione e organizzazione dell'azienda zootecnica. Inoltre, recentemente sono stati effettuati diversi tentativi per creare vacche transgeniche resistenti alla mastite (Wall et al., 2005; Maga et al., 2006; Hyvonen et al., 2006). Uno degli studi più interessanti ha visto la creazione di cinque vacche geneticamente modificate, tre delle quali hanno mostrato una significativa resistenza all'infezione mastica rispetto agli animali di controllo. Delle ghiandole mammarie infettate con *S. aureus*, si sono ammalate solo il 14 per cento nelle mucche transgeniche, contro il 71 per cento negli animali del gruppo di controllo (Wall et al., 2005). Tuttavia, non esiste la reale possibilità che le vacche OGM siano completamente al riparo dall'infezione mastitica. Inoltre, sebbene l'ingegneria genetica potrebbe aiutare a ridurre l'impatto della mastite sui costi di allevamento, la creazione di animali bioingegnerizzati potrebbe destare alcune perplessità sia da parte degli allevatori, che difficilmente acquisterebbero capi modificati geneticamente, sia da parte dei consumatori, che sono generalmente contrari a questo tipo di prodotti.

Negli ultimi anni l'interesse verso l'utilizzo di sostanze naturali ad azione antimicrobica è aumentato notevolmente. Questi peptidi e proteine, che normalmente svolgono un ruolo di difesa negli organismi da cui hanno origine (Boman, 1995), potrebbero essere proposti nelle procedure di profilassi o nel trattamento delle infezioni da *S. aureus* e *S. epidermidis* negli animali da allevamento. Studi preliminari sono stati condotti testando gli effetti della lattoferrina, da sola o in associazione agli antibiotici comunemente utilizzati, su vacche da latte (Lee et al., 2004; Komine et al., 2005; Komine et al., 2006). Sebbene i risultati siano incoraggianti, la lattoferrina sembra essere efficace solo se utilizzata in associazione agli antibiotici e contro ceppi batterici non antibiotico-resistenti. Ulteriori studi sono quindi necessari per la messa a punto del metodo e, soprattutto, per individuare altri composti che da soli, o in associazione alla lattoferrina, potrebbero essere efficacemente utilizzati nel trattamento della mastite.

1.2. I PEPTIDI ANTIMICROBICI

Durante gli ultimi dieci anni sono stati isolati moltissimi peptidi biologicamente attivi da un'ampia gamma di organismi comprendenti batteri, piante, insetti, anfibi e mammiferi (Nicolas e Mor, 1995; Zasloff, 2002). Questi peptidi svolgono un ruolo molto importante nei sistemi di offesa e di difesa dei diversi organismi (Boman, 1995).

1.2.1. Caratteristiche generali dei peptidi antimicrobici

Pur variando considerevolmente nel numero di residui, che va dai 10 ai 40 amminoacidi, i peptidi antimicrobici presentano delle caratteristiche comuni. Sono, infatti, cationici (ricchi di residui di lisina e arginina) e di natura anfipatica, in grado di interagire con la membrana cellulare e di distruggerne le normali funzioni formando canali ionici o pori, dissolvendo la membrana come se fossero dei detergenti, o determinando la comparsa di difetti nella membrana stessa (Erand, 1999; Oren, 1998; Rinaldi et al., 2002). A tali avvenimenti seguono l'inibizione della sintesi del DNA e delle proteine, eventi che determinano la morte cellulare (Park et al., 1998). Essi derivano da prepeptidi di circa 60-170 amminoacidi, rilasciati in forma matura da specifiche proteasi (Gautier et al., 1994).

La maggior parte dei precursori contiene:

- una sequenza segnale per il reticolo endoplasmatico;
- una prosequenza anionica di lunghezza variabile, che avrebbe la funzione di neutralizzare le cariche positive del peptide rendendolo inattivo;
- la sequenza del peptide maturo.

L'importanza dello studio dei peptidi antimicrobici è accresciuta dai fenomeni di resistenza ai tradizionali antibiotici, che sempre maggiormente si verificano oggi, dovuti ad un uso improprio degli stessi. Nei confronti di questi peptidi fino ad ora non si sono verificati fenomeni di resistenza e, pertanto, rappresentano una potenziale alternativa ai classici antibiotici, grazie alla loro rapida azione e alla loro tossicità altamente selettiva (Hancock e Lehrer, 1998).

1.2.2. Peptidi e proteine come fattori dell'immunità innata

Organismi di tutte le specie, comprendenti batteri, piante, insetti anfibi e mammiferi (Nicolas e Mor, 1995; Zasloff, 2002) producono molecole per proteggersi dagli attacchi esterni. Esse comprendono soprattutto peptidi e proteine, prodotti costitutivamente e in seguito a danno o infezione (Hancock e Lehrer, 1998), che svolgono un ruolo molto importante nei sistemi di difesa e di offesa dei diversi organismi (Boman, 1995). A lungo considerate dagli immunologi come un retaggio dell'evoluzione, caratteristico delle piante e degli animali meno evoluti (Tossi e Sandri, 2002), recentemente il loro ruolo è stato rivalutato, come parte integrante delle risposte immunitarie innate, le uniche condivise tra i regni animale e vegetale, a dimostrazione della loro grande importanza nel processo evolutivo di organismi multicellulari sempre più complessi (Zasloff, 2002). E' indubbio che moltissime specie, non si sarebbero conservate fino ad oggi, senza quei processi biologici che la Natura ha conservato con meccanismi e modalità molto simili, a dispetto della

stragrande variabilità e diversità esistente fra gli organismi di ciascun *Phylum*. Tutto fa pensare che i processi biologici abbiano “voluto” inizialmente convergere verso un primo traguardo evolutivo, che fornisse alle specie viventi una primordiale arma di difesa (Zaslhoff, 2002) con un'azione non specifica, ma veloce e aggressiva, che permettesse loro di difendersi dagli attacchi dei patogeni, per poter proseguire il loro cammino sulla strada dell'evoluzione.

Peptidi e proteine antimicrobiche sono le molecole “effettrici” dell'immunità innata (Boman, 2003). Esse hanno un'importanza doppia: proteggono circa l'80% delle specie animali e tutte le piante, ma giocano un ruolo importante anche nell'immunità degli animali superiori, fornendo una sorta di prima linea di difesa che stimola e coopera attivamente con le risposte immunitarie adattative (Tossi e Sandri, 2002).

Gli organismi viventi si difendono quindi dall'invasione di agenti estranei mediante due tipi di risposte: un'immunità cosiddetta “innata o naturale” e una “acquisita o specifica”.

Quest'ultima è l'espressione di uno stato di resistenza dell'individuo all'azione di agenti estranei (antigeni), che si sviluppa in seguito al loro contatto con l'organismo ospite. Le sue caratteristiche fondamentali sono la specificità e la memoria. La prima peculiarità è data dagli anticorpi prodotti dalle plasmacellule, che presentano una forte attività e una forte specificità nei confronti dell'aggressore. La seconda caratteristica, invece, è data dal clone di cellule di memoria che previene le successive infezioni dovute ad un antigene già incontrato in precedenza, con una risposta più forte e rapida (Abbas et al., 2000). Questa immunità, detta anche adattativa, è però apparsa tardivamente nel corso dell'evoluzione, ed esclusivamente nei vertebrati. All'incirca l'80% delle specie animali sopravvive senza questo elaborato sistema di difesa (Ferrandon et al., 2002).

L'immunità innata rappresenta, invece, un meccanismo di difesa preesistente all'incontro con l'antigene. Essa si avvale di diversi fattori meccanici e chimici (cute, saliva, secrezione gastrica), umorali (lisozima, complemento, interferone), di cellule (fagociti) e della flora batterica commensale. I peptidi antimicrobici rappresentano un'ulteriore via di risposta innata alle infezioni microbiche.

Il sistema innato è caratterizzato da:

- assenza di specificità, in quanto è attivo contro un largo spettro di microrganismi;
- assenza di memoria;
- velocità di risposta, dovuta all'immediata disponibilità dei peptidi immagazzinati ed alla loro rapida sintesi e diffusione;
- assenza di un meccanismo di riconoscimento del “self”: l'autodistruzione è evitata dalla compartimentalizzazione cellulare dei peptidi che sono conservati in granuli con membrane resistenti e/o sotto forma di propeptidi;
- basso costo energetico, in quanto i peptidi necessitano per la sintesi di una quantità di energia inferiore a quella richiesta all'animale per la complessa attivazione dell'immunità acquisita (Abbas et al., 2000).

Questo tipo di risposta immunitaria è stato dapprima scoperto nell'emolinfa di un insetto: la farfalla *Hyalophora cecropia*, da cui è stata isolata una famiglia di piccole proteine o peptidi, chiamate cecropine, caratterizzate da un'intensa attività antimicrobica (Ferrandon et al., 2002). Negli insetti tale sistema è indotto in risposta ad un'infezione microbica, a seguito della quale questi peptidi sono sintetizzati dalle cellule del corpo grasso (l'equivalente del fegato dei mammiferi), liberati nell'emolinfa dell'insetto e diffusi in tutto l'organismo, dove possono distruggere una vasta gamma di microrganismi. È stato dimostrato, inoltre, che sono gli stessi microrganismi che

invadono l'organismo ospite ad innescare la sintesi delle sostanze destinate ad annientarli. Ciò indica che gli insetti dispongono di sistemi in grado di rilevare la presenza di un'infezione e che l'allarme viene trasmesso fino alle cellule immunocompetenti che esprimono i geni codificanti per i peptidi antimicrobici (Steiner, 1981). Fino ad oggi sono stati caratterizzati più di 200 peptidi antimicrobici degli insetti, anche in specie di taglia molto piccola come la drosophila e l'anofele (Lemaitre, 1999).

Successivamente sono stati scoperti peptidi analoghi in numerose specie di anfibi, come la rana *Xenopus laevis*, nei quali la produzione di peptidi è costitutiva, anche se vengono rilasciati in risposta ad uno stimolo esterno (Hancock e Lehrer, 1998). La pelle di anfibio si è rivelata una ricca sorgente di tali peptidi con funzioni sia fisiologiche che difensive. Tali componenti sono prodotte e secrete da ghiandole granulari controllate da nervi simpatici che scaricano il loro contenuto sul dorso dell'animale in risposta ad una varietà di stimoli (Zasloff, 2002).

Alcuni di questi peptidi sono farmacologicamente attivi come le ceruleine, le tachichinine, le bradichinine ed i peptidi oppioidi; per molti di questi sono state trovate controparti nel cervello e nel tratto intestinale dei mammiferi. E' stato ipotizzato che tali peptidi possano avere un ruolo nella regolazione dell'equilibrio elettrochimico a livello dell'epitelio di questi anfibi, oltre che di difesa contro predatori e microrganismi. Un sistema simile è stato trovato anche nei mammiferi dove le defensine, una famiglia di peptidi a largo spettro di attività antimicrobica, sono immagazzinate nei granuli citoplasmatici dei neutrofili e nelle cellule di Paneth dell'intestino tenue (Todisco et al., 2002).

Anche le piante sintetizzano una vasta gamma di peptidi e proteine, con le quali rispondono in maniera molto veloce ed efficiente ai continui danni inflitti da funghi, batteri e insetti. Defensine sono state isolate da foglie, fiori, baccelli, tuberi, semi di numerosissime specie e sono probabilmente ubiquitarie nel regno delle piante, fatto che è consistente con il ruolo di difesa che si attribuisce loro (García-Olmedo et al., 1998). Sebbene siano localizzate principalmente nelle cellule epidermiche, esse si trovano anche nello xilema, nelle cellule stomatali e in quelle che circondano le cavità stomatiche, tutte aree dove avviene il contatto e la successiva infezione da parte dei patogeni. Tra le molecole ad attività antimicrobica di origine vegetale ricordiamo: fitoalessine, PR-proteins, chitinasi e β -glucanasi, inibitori di proteasi, proteine che inattivano i ribosomi e proteine ricche in cisteina. Quest'ultime sono caratterizzate dalla presenza di numerosi ponti disolfuro, che conferiscono loro una struttura tridimensionale molto stabile e la capacità di agire in maniera specifica contro le membrane degli organismi bersaglio (Broekaert et al., 1997).

L'immunità innata, dal punto di vista evolutivo, si è sviluppata più precocemente rispetto a quella acquisita; questo sistema di difesa innato, infatti, è l'unico a disposizione dei *phyla* inferiori (artropodi ed insetti). Negli organismi superiori, invece, il sistema innato funge da sistema di difesa complementare, coadiuvando quello acquisito nella difesa contro patogeni occasionali ed obbligati e contro la proliferazione della flora batterica naturale.

1.2.3. Meccanismo d'azione dei peptidi antimicrobici

Molti dei peptidi antimicrobici agiscono alterando direttamente la membrana delle cellule bersaglio (Thevissen et al., 2000).

Le membrane batteriche sono ricche di fosfolipidi anionici, come la fosfatidilserina ed il fosfatidilglicerolo: ciò determina un'interazione elettrostatica del peptide carico positivamente con la membrana stessa, che è alla base del successivo effetto di perturbazione del doppio strato. La differente composizione delle membrane è infatti alla base della selettività che alcuni di questi peptidi hanno per le cellule batteriche. Le cellule eucariotiche, come ad esempio gli ematociti, sono caratterizzate da un alto contenuto di fosfolipidi zwitterionici, come la fosfatidilcolina, la sfingomielinina e la fosfatidiletanolamina. Sono inoltre ricche di colesterolo, assente nei batteri, che sembra inibire l'azione di tali peptidi conferendo una certa resistenza alle membrane. Un altro fattore importante per la selettività è il valore del potenziale di membrana: un potenziale più negativo all'interno della cellula, tipico delle cellule batteriche (100-150 mV), facilita l'interazione del peptide con lo strato lipidico (Bechinger, 1997).

Nel caso di batteri Gram-negativi è stato visto che inizialmente il peptide interagisce con le molecole polianioniche di lipopolisaccaride della membrana esterna ed è poi in grado di permeabilizzarla o di essere captato all'interno. Nel caso dei batteri Gram-positivi il peptide è invece probabilmente attratto dagli acidi teicoici e teicuronici e da altri gruppi anionici che si trovano esternamente allo strato di peptidoglicano.

Sono stati proposti due principali meccanismi generali per spiegare l'effetto conseguente all'interazione dei peptidi con la membrana citoplasmatica:

- un effetto "detergente", in cui la struttura anfipatica di tali molecole interagirebbe con il doppio strato lipidico, distruggendone l'organizzazione e determinando la fuoriuscita dei componenti citoplasmatici;
- la formazione di canali, dovuta all'aggregazione dei monomeri di peptide nel doppio strato lipidico.

Il primo meccanismo è supportato da evidenze di permeabilizzazione del doppio strato in assenza di potenziale di membrana, dall'alta stechiometria di peptide richiesta per ottenere la lisi, in contrasto con lo scarso numero di molecole richiesto per la formazione di canali, e da studi strutturali che mostrano come alcuni peptidi adottino prevalentemente una posizione parallela al piano della membrana.

La formazione di un "poro" è stata invece supposta dalla presenza di effetti cooperativi tra peptidi e dal posizionamento perpendicolare del peptide nella membrana. In alcuni casi è stato proposto un processo in cui il peptide, dopo aver inizialmente ricoperto la membrana con uno strato orientato parallelamente alla superficie, si inserirebbe perpendicolarmente all'interno, una volta raggiunta una elevata concentrazione (Guerneve et al., 1998).

Vi sono, comunque, delle eccezioni al meccanismo generale d'azione sulla membrana: la buforina II, isolata dal *Bufo bufo*, è in grado di penetrare nella cellula e di inibire le funzioni cellulari legandosi al DNA e all'RNA (Park et al., 1998). Anche i peptidi ricchi in prolina ed arginina agiscono solitamente in modo differente, in quanto un'alta concentrazione di prolina è incompatibile con la formazione di una struttura anfipatica.

1.2.4. Classificazione dei peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici si possono dividere, per composizione e per struttura secondaria, in tre gruppi principali:

- peptidi contenenti cisteine, che formano nella maggior parte dei casi ponti disolfuro; si distinguono in due sottoclassi:

- a. peptidi contenenti più ponti disolfuro, che adottano una struttura a foglietto β antiparallelo (defensine, tachiplesine);
- b. peptidi con struttura a loop, contenenti un solo ponte disolfuro (bactenecine, brevinine, esculentine);
- peptidi che contengono un'alta percentuale di aminoacidi specifici (PR-39, apidecina ed i peptidi bovini ricchi in prolina e arginina Bac5 e Bac7);
- peptidi lineari, che si strutturano ad α -elica in ambiente idrofobico e che assumono struttura random in soluzione.

Questi ultimi rappresentano il gruppo più numeroso e più a fondo studiato, a cui appartengono la maggior parte dei peptidi antimicrobici "classici" e di cui si conoscono moltissimi esempi (cecropine, melittina, magainine, dermaseptine, temporine, bombinine) (Ferrandon et al., 2002).

1.2.5. Defensine

Le defensine sono peptidi immagazzinati nei granuli citoplasmatici dei neutrofili di mammifero (topo, ratto, coniglio, uomo), nelle cellule di Paneth dell'intestino tenue (Todisco et al., 2002) e nell'endosperma dei semi di molte specie vegetali (Jing et al., 2003; Hancock e Lehrer, 1998).

Le α -defensine sono costituite da 29-30 aminoacidi con elevato contenuto di arginina e 6 residui di cisteina, le cui posizioni sono conservate all'interno della famiglia. Queste molecole sono accumulate nei granuli dei neutrofili in forma attiva e sono rilasciate nei vacuoli fagocitici. I neutrofili hanno la capacità di fagocitare e distruggere l'agente invasore: questi peptidi costituiscono, quindi, un meccanismo ausiliario all'uccisione "ossigeno dipendente" di cui sono responsabili i leucociti (Ashitani et al., 2002).

Dai neutrofili bovini è stato isolato un gruppo di 13 defensine, le β -defensine, lunghe 38-42 residui contenenti sempre 6 cisteine in posizioni conservate, ma diverse dalle α -defensine (Vatta et al., 2000). Simile a questi peptidi è anche il peptide antimicrobico tracheale (TAP), isolato dagli epitelii delle vie aeree bovine (Todisco et al., 2002).

Le defensine sono peptidi compatti, globulari, formati in maggior parte da 3 foglietti β antiparalleli senza α elica; i 3 ponti disolfuro conferiscono una certa rigidità alla struttura. La defensina umana HNP-3 in cristalli forma dei dimeri a forma di cesto la cui base è idrofobica, mentre i bordi contengono le catene polari dell'N- e del C-terminale. Nonostante la differenza strutturale con i classici peptidi antimicrobici che formano pori intermembrana, anche le defensine sono in grado di formare pori multimerici e di indurre così la lisi di vescicole lipidiche. L'anfipaticità è dunque una caratteristica molto conservata, anche nel caso di strutture tridimensionali diverse dalla classica α -elica: questo dimostra la sua importanza per l'interazione con la membrana.

Il fatto che peptidi di così diversa composizione e struttura agiscano in modo simile, fa pensare che tali molecole possano essere il prodotto di un'evoluzione convergente.

1.2.6. Le puroindoline

Le puroindoline, presenti nelle cariossidi di frumento (Jing et al., 2003), sono proteine basiche ricche di cisteine, che, nel loro insieme, costituiscono la friabilina (Morris, 2002).

Questa è una proteina di 13.000 Da (Blochet et al., 1993; Gautier et al., 1994), coinvolta nella sofficità dell'endosperma (Greenwell e Schofield, 1998), presente in maggiore abbondanza sulla superficie dei granuli di amido in grani soft e in quantità minore su quella dei grani hard (Capparelli et al., 2003). Secondo Oda e Schofield (1997), i grani soft e hard contengono approssimativamente la stessa quantità di puroindoline, ma differiscono nella quantità di proteina associata ai granuli d'amido (friabilina), che è elevata nei grani soft e bassa nei grani hard. Sulla base di questi risultati, essi hanno proposto che la tessitura del chicco è determinata esclusivamente dalla parte di friabilina presente sui granuli di amido.

Le puroindoline sono simili al 55%, e sono chiamate puroindolina a (PINA) e puroindolina b (PINB). Grazie alla presenza di un unico dominio ricco di triptofano, esse hanno una forte affinità a legare i lipidi polari (Branlard et al., 2003).

Sulla base di tutte queste informazioni è stata proposta una struttura tridimensionale delle puroindoline (Figura 2). Nel modello proposto, il dominio ricco di triptofano è incluso nel cappio tra l'elica uno e l'elica due ed è probabilmente in una conformazione a foglietto β (Giroux e Morris, 1997; Lillemo e Morris, 2000).

Le puroindoline rappresentano, quindi, le basi molecolari dell'hardness delle cariossidi di grano, che determina la qualità e l'uso finale del frumento (Capparelli et al., 2003). Quando entrambe le puroindoline sono presenti nel loro stato funzionale, il grano è soft; quando, una delle due puroindoline è assente o la sua funzionalità è alterata da una mutazione, il grano è hard (Morris, 2002). La funzione biochimica delle puroindoline non è ancora conosciuta, ma è chiaro che sia la puroindolina a che la puroindolina b devono essere presenti nella loro forma funzionale per dare un'endosperma soffice.

Greenblatt et al. (1995) hanno dimostrato che l'interazione di PINA e di PINB con l'amido è mediata dai residui polari lipidici presenti sulla superficie dei granuli di amido purificati. Sulla superficie dei granuli d'amido dei grani soft, i glicolipidi e i fosfolipidi sono abbondanti, mentre sono pochi su quella dei grani hard. Le puroindoline dividono una debole ma significativa omologia di sequenza con le proteine che trasferiscono i lipidi (LTP – lipid transfer protein). Durante la maturazione dei semi di grano, i granuli di amido in via di sviluppo sono circondati dalla membrana amiloplastica. Un possibile ruolo delle puroindoline nel determinare l'hardness dell'endosperma, potrebbe essere quello di stabilizzare questa membrana lipidica a due strati durante la fase di essiccamento. Durante la disidratazione dell'endosperma le puroindoline preserverebbero la membrana amiloplastica dal collassare totalmente e quindi renderebbero i granuli di amido separati dalla matrice proteica da uno strato sottile di residui di membrana. Nei grani hard, invece, le puroindoline non sarebbero capaci di stabilizzare la membrana durante la maturazione del grano, causando un contatto più diretto e un legame più stretto dei granuli d'amido alla matrice proteica (Lillemo e Morris, 2000).

1.2.7. Le puroindoline come agenti antimicrobici

Oltre ad essere importanti dal punto di vista tecnologico determinando il carattere "hardness" del frumento, le puroindoline mostrano un'interessante attività antimicrobica (Dubreil et al., 1998). E' stato visto, ad esempio, che tali proteine sono capaci di aumentare la resistenza alle malattie in piante di riso transgeniche (Krishnamurthy et al., 2001). Ciò indica che le puroindoline svolgono un'importante ruolo nella difesa dei semi di grano contro diversi patogeni. Inoltre, le puroindoline posseggono una potente attività antimicrobica *in vitro* e mostrano un effetto inibitorio sinergico sulla crescita di funghi quando utilizzate insieme ad altre proteine antimicrobiche presenti nelle cariossidi di grano (Marion et al., 1994). È stata attribuita, inoltre, un'attività antimicrobica alla puroindolina a, in grado di interagire con le membrane cellulari e di legare fortemente i lipidi polari (Guerneve et al., 1998). L'attività antimicrobica delle puroindoline è probabilmente attribuibile alle loro caratteristiche strutturali. Esse, infatti, sono ricche di residui aromatici e basici e, in particolare, PINA ha un dominio ricco in triptofano, che è parzialmente troncato in PINB, e che conferisce ad entrambe le proteine una forte affinità a legare i lipidi polari (Branlard et al., 2003).

1.3. APPLICAZIONI DELLE PROTEINE AD ATTIVITA' ANTIMICROBICA

I peptidi antimicrobici mostrano un ampio spettro di attività: uccidono le cellule bersaglio rapidamente e sono attivi contro numerosi ceppi batterici antibiotico resistenti e di rilevanza clinica (Hancock and Chapple, 1999; Scott and Hancock, 2000; Zasloff, 2002). I batteri hanno un elevato potenziale evolutivo grazie alla loro crescita veloce, all'alto tasso di mutazioni e alla capacità di scambiare geni orizzontalmente. La diffusione di ceppi batterici antibiotico resistenti è la dimostrazione delle notevoli risorse genetiche di questa classe di patogeni. In teoria, è possibile continuare a sviluppare nuovi antibiotici diretti contro i batteri antibiotico-resistenti ma, inevitabilmente, i patogeni diventerebbero resistenti al nuovo antibiotico. Per spezzare questo ciclo vizioso, è necessario sviluppare strategie antibatteriche alternative ai convenzionali antibiotici. E' stato dimostrato che per i batteri è molto più difficile diventare resistenti alle proteine ad attività antimicrobica che alle molecole sintetiche. Poiché il bersaglio di tali proteine è la membrana cellulare, i batteri dovrebbero riarrangiare o modificare del tutto la composizione lipidica della loro membrana, un'operazione non conveniente perché sicuramente "costosa" per tutte le specie microbiche (Zasloff, 2002).

Le proteine antimicrobiche di origine vegetale, e quindi le puroindoline, possono rappresentare dunque una classe potenziale di agenti terapeutici (Egorov et al., 2005; Garcìa-Olmedo et al., 2001). In particolare, si è pensato ad un loro possibile utilizzo contro batteri antibiotico resistenti, tra cui lo *Staphylococcus aureus* e lo *Staphylococcus epidermidis*, agenti patogeni della mastite, una delle più importanti patologie degli animali da reddito (Spranger, 2000).

1.4. L'AIUTO DELLE BIOTECNOLOGIE

Un quadro così ampio per il futuro ed esteso impiego di proteine antimicrobiche naturali, al posto dei prodotti di sintesi o degli antibiotici tradizionali, lascia facilmente immaginare la quantità di prodotti che sarebbe necessaria. La possibilità di utilizzare cellule o organismi facilmente manipolabili per l'espressione di geni codificanti proteine di interesse industriale apre la prospettiva alla produzione e la commercializzazione di tali prodotti in tempi e costi contenuti. Il prezzo di vendita di qualunque prodotto industriale dipende infatti dai costi necessari all'intero processo di produzione, compresi quelli relativi alle operazioni connesse con la sua purificazione.

Tra i molti sistemi disponibili per la produzione di proteine eterologhe, il batterio Gram-negativo *E. coli* è uno dei più utilizzati per la sua capacità di crescere rapidamente ad alta densità su terreni poco costosi, per i suoi meccanismi genetici ampiamente conosciuti e per la disponibilità di un gran numero di vettori di clonaggio e di ceppi mutanti ospiti. Sebbene non ci sia nessuna garanzia che il prodotto genico ricombinante sia accumulato in *E. coli* ad alti livelli in una forma completa e biologicamente attiva, molti sforzi sono stati diretti verso il miglioramento della prestazione e della versatilità di questo microrganismo. Il problema maggiore dell'espressione eterologa in *E. coli* è rappresentato dall'incapacità dei microrganismi procarioti di eseguire modifiche post-traduzionali che sono invece presenti nelle proteine eucariotiche, quali la glicosilazione, la fosforilazione, l'acetilazione, l'acilazione, la solfatazione, la maturazione di precursori proteici e la γ -carbossilazione che sono spesso necessarie per la produzione di un prodotto stabile e funzionale (Sørensen e Mortensen, 2005).

Recentemente sono stati introdotti sul mercato la serie dei vettori pET per l'espressione di proteine ricombinanti in cellule batteriche. Nel sistema pET, i geni bersaglio sono posti a valle del promotore del fago T7, e in cui la RNA polimerasi del fago T7, che possiede una maggiore attività trascrizionale rispetto all'RNA polimerasi nativa di *E. coli*, è codificata *in trans* dal cromosoma dell'ospite. L'espressione del gene di interesse indotta dall'aggiunta di isopropylthio- β -galactoside (IPTG) al mezzo di coltura batterico e culmina con la trascrizione e la traduzione del gene bersaglio. La T7 RNA polimerasi presenta un così elevato grado di processività e selettività per il suo promotore, che incanala la gran parte delle risorse della cellula batterica verso l'espressione della proteina ricombinante, i cui livelli possono raggiungere il 50% delle proteine cellulari totali dopo poche ore di induzione (Studier e Moffat, 1986).

Di notevole interesse, sono anche i vettori della serie pGEX, che permettono un'elevata espressione, inducibile da IPTG, dei geni fusi con la Glutathione S-Transferasi (GST). La proteina ricombinante di interesse fusa alla GST può essere purificata per cromatografia d'affinità utilizzando glutathione immobilizzato. L'alta solubilità della GST aumenta anche la solubilità della proteina target, favorendone l'accumulo all'interno del citoplasma della cellula batterica.

Per quanto riguarda i batterici ospiti, recentemente è stato introdotto sul mercato il ceppo di *E. coli* ORIGAMITM B, che deriva dal mutante lacZY delle BL21. Tale ceppo possiede delle mutazioni a carico del gene della tioredoxina riduttasi (*trx*B) e della glutathione riduttasi (*gor*), e promuove la formazione di ponti disolfuro nelle proteine eterologhe, con conseguente incremento della solubilità e dell'attività delle stesse. In più, le cellule ORIGAMITM B, permettono un controllo preciso dei livelli di espressione

della proteina di interesse a seconda della concentrazione di IPTG utilizzata. Il loro genotipo favorisce inoltre la stabilità della proteina ricombinante prodotta.

1.5. SCOPO DELLA TESI

Studi recenti condotti sulle difese immunitarie, hanno rilevato analogie tali da sostenere l'ipotesi di un'origine comune dei meccanismi di difesa innata nel mondo vivente, animale e vegetale. Questi studi potranno condurre allo sviluppo di nuovi farmaci: in un momento in cui si moltiplicano i fenomeni di resistenza agli antibiotici comunemente utilizzati e in cui la scoperta di nuovi antibiotici si fa attendere, l'impiego dei peptidi che difendono gli invertebrati potrebbe diventare una nuova arma efficace contro gli attacchi batterici.

Pertanto, il presente lavoro di tesi ha interessato la produzione ricombinante di puroindoline di grano (PINA e PINB) e il loro utilizzo su cellule batteriche e animali, per determinarne l'attività antimicrobica. A tal fine i geni delle puroindoline sono stati espressi in diversi vettori e in diversi ospiti allo scopo di individuare il sistema ottimale di espressione, in base alle caratteristiche e alla resa proteica finale. L'azione antimicrobica delle puroindoline ricombinanti è stata poi saggiata su patogeni vegetali e animali e, in particolare, su due batteri di interesse clinico quali lo *Staphylococcus aureus* e lo *Staphylococcus epidermidis*. Sebbene siano microrganismi commensali che si ritrovano normalmente nella flora della pelle e delle mucose, recentemente sono stati considerati organismi saprofitici. Essi rappresentano attualmente i principali agenti di mastite contagiosa negli allevamenti bovini e risultano di notevole interesse data la continua emergenza di ceppi resistenti agli antibiotici.

In virtù di quanto detto finora, il presente lavoro propone l'utilizzo di puroindoline ricombinanti nella prevenzione delle infezioni mastitiche da *S. aureus* e *S. epidermidis*, con l'obiettivo di condizionare favorevolmente l'ambiente della mammella e renderlo meno disponibile verso nuove infezioni, non escludendo al tempo stesso un possibile impiego terapeutico su infezioni intramammarie già presenti.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Materiali

La cultivar di *Triticum aestivum* L. (Centauro) utilizzata per l'estrazione del DNA è stata fornita gentilmente dal Consorzio Nazionale Sementi (Ravenna, Italia). I ceppi di *Escherichia coli* TOP10, BL21 Star, BL21pLysS e DH5 α sono stati comprati dall'Invitrogen (Milano, Italia). I vettori di espressione pET100/D-TOPO e pGEX-4T-3 sono stati forniti rispettivamente dall'Invitrogen e dall'Amersham Biosciences. Il ceppo ORIGAMITM B di *Escherichia coli* è stato comprato dalla Novagen (San Diego, CA, USA). La linea cellulare tumorale di monociti-macrofagi murini J774 è stata acquistata all'American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). Gli anticorpi Rabbit α PINA e Rabbit α PINB sono stati forniti dal Dr. M. Giroux (Università del Montana, Canada).

2.1.1. Prodotti da forno

Preparazioni alimentari industriali costituite principalmente da frumento tenero sono state utilizzate per verificare la presenza delle puroindoline. In particolare sono stati testati: 3 differenti snack, quali Saccottino (Mulino Bianco), Plumcake (Parmalat), Fetta al latte (Kinder); 5 biscotti, quali Macine e Galletti (Mulino Bianco), Goccioline e Pavesini (Pavesi), fette biscottate (Colussi); 3 diverse tipologie di pane di frumento tenero in cassetta (IPERCOOP). Inoltre, è stato utilizzato pane di frumento duro in cassetta come controllo negativo.

2.1.2. Colture batteriche

Sono stati utilizzati i seguenti ceppi : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Clavibacter michiganensis* come Gram positivi, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas syringae phaseoli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora carotovora* come Gram negativi. *Staphylococcus aureus* è stato isolato da latte di un bovino affetto da mastite; *Staphylococcus epidermidis* è stato isolato da una ferita infetta di un bovino.

2.2. Produzione di anticorpi

Anticorpi policlonali diretti contro PINA e PINB sono stati prodotti mediante l'immunizzazione di ratti con il peptide sintetico **DRASKVIQEAKNLPPR** per PINA (Rat α PINA) e **GEVFKQLQRAQSLPSK** per PINB (Rat α PINB) (Krishnamurthy e Giroux, 2001). Questi peptidi corrispondono alla regione C-terminale della puroindolina matura del grano e sono stati prodotti dal CNR di Avellino.

Per generare anticorpi specifici rivolti contro molecole di piccole dimensioni è necessario legarle a delle macromolecole; in questo sistema la molecola più piccola è denominata aptene, mentre la macromolecola è chiamata carrier. Il complesso

aptene-carrier, a differenza dell'aptene libero, si comporta come immunogeno e pertanto è in grado di generare una risposta immune specifica.

La prima immunizzazione del ratto ha previsto l'iniezione del coniugato peptide-carrier, sciolto in una soluzione salina NaCl allo 0.15%, con l'aggiunta dell'adiuvante di Freund. Quest'ultimo è costituito da olio minerale (liquido di paraffina), da un emulsionante e da micobatteri inattivati al calore. L'antigene, in questo modo, è somministrato in forma emulsionata in olio di paraffina che ritarda la sua dell'antigene, favorendo, in tal modo, una stimolazione continua e prolungata nel tempo. L'emulsione fa aumentare il numero di linfonodi che l'antigene può raggiungere attraverso il sistema linfatico e perciò il numero dei linfociti B potenzialmente attivi. I micobatteri stimolano la produzione di anticorpi creando un'inflammatione a livello locale. Nella seconda e terza immunizzazione è stato, invece, usato un adiuvante incompleto di Freund, costituito solo dall'olio di paraffina.

2.3. Purificazione degli anticorpi

Le IgG sono state purificate utilizzando particelle magnetiche Dynabeads (DYNAL Biotech) PROTEIN G. Le particelle (100 µl) sono state lavate 3 volte con 1 ml di PBS-EDTA 0.15 M pH 7.2. Alle particelle, recuperate con l'aiuto di un magnete, sono stati aggiunti 500 µl di siero diluito 1/50. Dopo incubazione di 1 ora a temperatura ambiente in agitazione, le particelle magnetiche sono state lavate 3 volte con PBS. L'eluizione delle IgG è stata condotta utilizzando 30 µl di tampone citrato 0.1 M pH 2-3. Il pH è stato neutralizzato con 4 µl di TRIS 1M a pH 9. Le particelle sono state lavate 1 volta con PBS-TWEEN 20 allo 0.1% e 3 volte con PBS. È stato poi condotto un ulteriore passaggio di purificazione aggiungendo alle particelle magnetiche il siero precedentemente recuperato.

2.4. Estrazione delle proteine totali

Le cariossidi di frumento sono state frantumate con un macinino e setacciate per ottenere la farina. A 100 mg di farina sono stati aggiunti 500 µl di tampone di estrazione del Kit "Duro Test" (Rhône diagnostics) e il tutto è stato incubato in agitazione per 30 minuti. Il campione è stato poi centrifugato a 10000 rpm per 5 minuti ed è stato prelevato il surnatante contenente le proteine. Dall'estratto così ottenuto sono state purificate le puroindoline, poi utilizzate per effettuare test *in vitro*.

2.5. Immunoassorbente

La purificazione mediante l'uso di anticorpi specifici è stata eseguita al fine di separare le puroindoline dalle altre proteine della cariosside.

Il saggio consta di 3 parti fondamentali, che sono:

- 1) Formazione di un legame covalente tra l'anticorpo e le particelle di latex che espongono gruppi amminici
- 2) Formazione del legame anticorpo-antigene
- 3) Rottura del legame anticorpo-antigene e recupero dell'antigene.

2.5.1. Formazione del legame covalente particelle-anticorpo

Le particelle di latex (50 μ l) sono state preventivamente lavate per 3 volte con PBS. Sono state attivate in agitazione, over-night a temperatura ambiente, con glutaraldeide 8%. La glutaraldeide è stata poi allontanata per centrifugazione e 3 successivi lavaggi con PBS. Le particelle sono state lavate e incubate, in agitazione, con 30 μ g di anticorpo per 4-5 ore a temperatura ambiente, in modo da consentire il legame tra il latex e l'anticorpo. Il tutto è stato poi centrifugato per allontanare l'anticorpo non legato e le particelle sono state trattate con etanolamina e milk 2%, per saturare eventuali siti ancora liberi sulla superficie delle particelle.

2.5.2. Formazione del legame anticorpo-antigene

Le particelle a cui è stato legato covalentemente l'anticorpo purificato, sono state lavate 2 volte con PBS e poi incubate over-night con 1 ml di estratto proteico (ottenuto come descritto nel paragrafo 2.4), ad una concentrazione (determinata attraverso il saggio Bio Rad) di 1 mg/ml. La specificità dell'anticorpo utilizzato ci assicura che solo le puroindoline a e b si leghino all'anticorpo, mentre tutte le altre proteine vengono eliminate attraverso 2 successivi lavaggi con PBS.

2.5.3. Rottura del legame anticorpo-antigene e recupero dell'antigene

Il recupero dell'antigene purificato è stato effettuato incubando le particelle con 400 μ l di un tampone glicina 0.1 M pH 2.5, che determina la rottura del legame antigene-anticorpo e il rilascio dell'antigene in soluzione. La soluzione è stata poi tamponata con 20 μ l di PBS pH 8 e poi centrifugata a 10000 rpm per 5 minuti. Il surnatante, contenente le puroindoline purificate, è stato recuperato e, dopo aver determinato la concentrazione proteica mediante il saggio Bio Rad, è stato utilizzato per effettuare saggi *in vitro*.

2.6. Test citofluorimetrico

La citofluorimetria a flusso ha permesso, utilizzando anticorpi specifici, di quantizzare le due puroindoline all'interno della cariossida. Il test citofluorimetrico è stato condotto in tubi di polietilene opportunamente pretrattati con una soluzione di milk al 2% in PBS, allo scopo di rendere inerte il polietilene e di evitare interazioni con il lattice. Circa 40000 particelle di lattice da 10 μ m di diametro (Poliscience, Milano), sono state sospese in 900 μ l di tampone borato 0.1 M pH 8.5, e incubate con 100 μ l di antigene per 3 ore a temperatura ambiente. Dopo aver centrifugato a 11000 rpm per 5 minuti per eliminare tutto ciò che non si è legato alle particelle di lattice, il pellet è stato risospeso in 300 μ l di milk 2%. Tale operazione è necessaria per saturare tutti i siti delle particelle di lattice rimasti liberi, dove l'antigene non si è legato, ed evitare quindi reazioni aspecifiche tra l'anticorpo e le particelle stesse. Dopo aver incubato per 30 minuti a temperatura ambiente, il campione è stato lavato con PBS pH 7.2 e addizionato di 100 μ l di antisiero opportunamente diluito, contenente l'anticorpo diretto contro la proteina in analisi. Dopo incubazione per 2 ore in agitazione a

temperatura ambiente, un ulteriore lavaggio ha consentito l'allontanamento degli anticorpi che non hanno legato l'antigene. Successivamente è stato aggiunto il secondo anticorpo, rivolto verso il primo (Goat α Rat^{FITC}) alla diluizione 1/500. Dopo incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente e al buio, il campione è stato lavato 2 volte con PBS e sottoposto ad analisi citofluorimetrica. Di ogni campione è stato analizzato anche il controllo negativo, in cui è stato omesso il primo anticorpo.

Ciò che viene rilevato dal citofluorimetro e poi trasformato in segnale digitale, è la fluorescenza data dalle particelle di lattice alle quali si sono legati: l'antigene, l'anticorpo specifico contro l'antigene e il secondo anticorpo fluorescente rivolto verso il primo anticorpo. I risultati sono stati espressi in termini di mediana, che rappresenta il numero di eventi fluorescenti maggiormente frequenti.

2.7. Microscopia a immunofluorescenza

Le cariossidi mature sono state prima idratate in acqua distillata per un giorno e poi tagliate tangenzialmente. Sono state preparate delle sezioni di 3-4 μ m come descritto in letteratura (Cai G. et al., 2002). Una volta pronte, le sezioni sono state incubate come segue: 30 minuti con 3% di siero di capra preimmune diluito in PBS (soluzione bloccante, utilizzate anche per diluire gli anticorpi); 2 ore con gli anticorpi primari (α PINA ed α PINB) diluiti 1:50; 30 minuti con PBS/0.2% Tween 20 (T-PBS); 1 ora a 37°C al buio con gli anticorpi secondari (Goat α Rat^{FITC466} diluito 1:50 e Goat α Rabbit^{Alexa594} diluito 1:25). Dopo un lavaggio di 30 minuti con T-PBS, i campioni sono stati asciugati su vetrino, montati con Citofluor (Glicerolo-PBS, Agar England) e osservati con un microscopio ottico Zeiss Axiophot. La specificità degli anticorpi è stata valutata incubando i campioni controllo con il siero preimmune. Un ulteriore controllo è stato condotto utilizzando una cultivar di frumento duro.

2.8. Estrazione del DNA genomico

Il DNA è stato estratto da 1 g di tessuto vegetale. Le foglie sono state frantumate finemente in azoto liquido e incubate per 30 minuti a 60°C in tampone di estrazione (2% CTAB, 1.4 M NaCl, 0.1% β -mercaptoetanolo, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl pH 8, 1% PVP). Al campione sono stati poi aggiunti 20 ml di una soluzione cloroformio:alcool isoamilico in rapporto 24:1. Dopo incubazione a temperatura ambiente per 20 minuti in agitazione, il campione è stato centrifugato a 7000 rpm per 10 minuti. La fase acquosa, contenente gli acidi nucleici, è stata recuperata. La precipitazione degli acidi nucleici è stata effettuata aggiungendo un ugual volume di isopropanolo freddo ed incubando per 30 minuti a -20° C. Successivamente il campione è stato centrifugato a 7000 rpm per 30 minuti a 4°C. Il surnatante è stato eliminato e il DNA precipitato è stato risospeso in 100 μ l di acqua. Per eliminare le interferenze dovute alla presenza di RNA, sono stati aggiunti 3 μ l di RNasi (10 mg/ml), incubando per 30 minuti a 37°C.

Per verificare la riuscita dell'estrazione e la bontà del DNA da analizzare, sono stati caricati 10 μ l del campione su un gel d'agarosio allo 0.7% (p/v) colorato con bromuro di etidio. Dopo la corsa elettroforetica, il gel è stato visualizzato ai raggi UV ed il campione è stato quantificato mediante confronto con lo standard λ Hind III, grazie al programma Quantity One Gel Doc 2000 (Bio Rad).

2.9. Sistemi di espressione

I geni *pina* e *pinb*, che codificano per la puroindolina a e la puroindolina b rispettivamente, sono stati espressi in quattro differenti sistemi utilizzando i vettori pET100/D-TOPO (pET100) e pGEX-4T-3 (pGEX) (Tabella 1).

Il vettore pET100 è un plasmide di espressione a medio numero di copie, in cui i geni bersaglio sono posti a valle del promotore del fago T7, e in cui la RNA polimerasi del fago T7, che possiede una maggiore attività trascrizionale rispetto all'RNA polimerasi nativa di *E. coli*, è codificata *in trans* dal cromosoma dell'ospite. L'espressione del gene di interesse è indotto dall'aggiunta di isopropylthio- β -galactoside (IPTG) al mezzo di coltura batterico. L'IPTG è un induttore della attività della β -galattosidasi nei batteri, e influenza l'attività del gene *lac*. Esso, infatti, converte il repressore *lac* (codificato dal gene *lac* e legato al DNA sull'operatore), nella sua forma inattiva, incapace di legarsi all'operatore. In tal modo l'RNA polimerasi può legarsi al promotore e dar luogo alla trascrizione dell'mRNA, che viene poi tradotto in proteine. Questo processo, quindi, culmina con la trascrizione e la traduzione del gene di interesse che porta al suo ammino-terminale un tag di sei istidine (6xHys). La presenza del tag permette una facile purificazione della proteina ricombinante su una specifica resina al nichel (Champion pET directional TOPO expression kits instruction manual, Invitrogen).

Il vettore pGEX permette un'alta espressione, inducibile da IPTG, dei geni fusi con la Glutathione S-transferasi (GST). Le proteine di fusione presentano la GST all'ammino-terminale e la proteina di interesse al carbossi-terminale (GST gene fusion system handbook, Amersham Biosciences). La proteina ricombinante di interesse fusa alla GST può essere purificata per cromatografia d'affinità utilizzando glutathione immobilizzato. L'alta solubilità della GST aumenta anche la solubilità della proteina target, favorendone l'accumulo all'interno del citoplasma della cellula batterica (<http://www.emb.de/Externalinfo/protein-unit/draft-frames/flowchart>).

Il vettore pET100 contenente *pina* o *pinb* è stato introdotto prima in cellule di *E. coli* TOP10 (per l'analisi del plasmide e la propagazione) e poi negli ospiti BL21 Star (BL21*) e BL21pLysS (pLysS). Le BL21* aumentano la stabilità dei trascritti e il livello di espressione delle proteine in sistemi basati sul promotore del fago T7. Esse posseggono una mutazione a carico del gene che codifica per l'Rnasi E (*rne 131*) che risulta quindi incapace di degradare l'mRNA sintetizzato dalla RNA polimerasi. Il ceppo pLysS offre la possibilità di esprimere prodotti di geni tossici. Esso contiene il plasmide pLysS, che esprime costitutivamente bassi livelli di lisozima del fago T7, il quale riduce il livello basale di espressione dei geni, inibendo l'attività della RNA polimerasi a cui si lega (Champion pET directional TOPO expression kits instruction manual, Invitrogen).

Il vettore pGEX contenente *pina* o *pinb* è stato invece utilizzato per trasformare cellule competenti di *E. coli* DH5 α (Invitrogen), gli ospiti più comunemente utilizzati nei clonaggi di routine, e il ceppo ORIGAMITM B, che promuove la formazione di ponti disolfuro e l'incremento della solubilità e dell'attività delle proteine di interesse.

2.10. Clonaggio nel vettore pET100 dei geni *pina* e *pinb* (Hys-PINA, Hys-PINB)

I primer utilizzati per l'amplificazione dei geni *pina* e *pinb* sono illustrati nella Tabella 2. I primer forward sono stati disegnati in modo da contenere una regione di quattro

basi (CACC) complementare alla regione overhang (GTCC) del plasmide pET100. I primer reverse sono stati disegnati in modo da contenere il codone di stop (TTA per *pina* e CTA per *pinb*). La reazione di PCR è stata condotta in un volume finale di 25 µl contenenti: 1 µl di template (corrispondente a 25 ng di DNA per *pina* e 50 ng per *pinb*), 1X Pfu-DNA polimerasi buffer, 0.2 µM di ogni primer, 0.2 mM di dNTP e 1.25 U di Pfu-DNA polimerasi (Promega). Il profilo termico comprende un primo step di denaturazione a 95°C per 4 minuti, un secondo step di 30 cicli, ognuno di 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 55°C ed 1 min a 72°C; uno step finale a 72°C per 10 minuti. I prodotti risultanti dall'amplificazione (358 bp per *pina* e 364 bp per *pinb*) sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% colorato con Bromuro d'Etidio e purificati con il *Gfx PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences).

2.11. Clonaggio nel vettore pGEX dei geni *pina* e *pinb* (GST-PINA, GST-PINB)

I primer utilizzati per l'amplificazione dei geni di *pina* e *pinb* sono riportati nella Tabella 2. I primer forward sono stati disegnati in modo da contenere, nell'ordine: il sito di restrizione per EcoR1 (GAATTC) preceduto da due basi ancora (CG), una base (C) per mantenere la cornice di lettura esatta, una regione linker codificante per 4 glicine ed 1 prolina (GGTGGTGGTGGTCCG), per separare meglio la GST e la puroindolina e quindi favorire il loro folding corretto in maniera indipendente. I primer reverse sono stati disegnati in modo da contenere, nell'ordine: il sito di restrizione di Xho1 (CTCGAG) preceduto da tre basi ancora (CCG) ed un codone di stop (ATC) solo per *pina* (*pinb*, invece, contiene già un codone di stop nella propria sequenza). La reazione di PCR è stata condotta in un volume finale di 25 µl contenenti: 1 µl di template (corrispondente a 25 ng di DNA per *pina* e 50 ng per *pinb*), 1X Pfu-DNA polimerasi buffer, 0.2 µM di ogni primer, 0.2 mM di dNTP e 1.25 U di Pfu-DNA polimerasi (tutto della Promega). Il profilo termico comprende un primo step di denaturazione a 95°C per 4 minuti; un secondo step di 30 cicli, ognuno di 30 secondi a 95°C, 30 secondi alla T di annealing (59°C per *pina* e 54.5°C per *pinb*) ed 1 min a 72°C; uno step finale a 72°C per 4 minuti. I prodotti risultanti dall'amplificazione (388 bp per *pina* e 393 bp per *pinb*) sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio all'1% colorato con Bromuro d'Etidio e purificati utilizzando il *Gfx PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences).

2.12. Purificazione di frammenti di DNA da gel di agarosio

I prodotti di PCR sono stati purificati da gel di agarosio utilizzando il *Gfx PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Biosciences). La porzione del gel contenente il frammento di DNA da purificare è stata tagliata con un bisturi e trasferita in un tubo da 2 ml. Successivamente sono stati aggiunti 10 µl di "capture buffer" ogni 10 mg di gel e il campione è stato agitato vigorosamente. La miscela è stata incubata a 60°C per circa 10-15 minuti, in modo da permettere la completa solubilizzazione del gel, e quindi trasferita in una mini-colonna. Il campione è stato centrifugato a 12000 x g per 1 minuto e la colonna è stata poi lavata con 500 µl di "wash buffer" centrifugando per 1 minuto a 12000 x g. Il DNA è stato eluito con 50 µl di acqua distillata e conservato a -20°C.

2.13. Digestione di DNA con enzimi di restrizione

Il vettore di espressione pET100 è predigerito e non ha bisogno dello step di ligation. Il vettore pGEX e i prodotti di amplificazione, invece, sono stati digeriti in 80 µl di reazione contenente: 4 µg di DNA (plasmidico o prodotto di PCR), 3 unità di ogni enzima di restrizione e 10 µl di tampone 10x specifico per ogni enzima. La miscela di reazione è stata incubata a 37°C per 3 ore (DNA plasmidico) o 5 ore (prodotto di PCR). Gli enzimi di restrizione utilizzati sono prodotti di Biolabs, Promega, Gibco BRL ed Invitrogen. Il digerito è stato poi purificato utilizzando il *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit* (Amersham Biosciences) e 2 µl sono stati caricati su un gel d'agarosio allo 0.7% (p/v) colorato con Bromuro d'Etidio. Dopo la corsa elettroforetica, il gel è stato visualizzato ai raggi UV ed il campione è stato quantificato mediante confronto con lo standard λ Hind III, grazie al programma Quantity One Gel Doc 2000 (Bio Rad).

2.14. Reazioni di ligazione

La reazione di ligazione per il clonaggio nel vettore di espressione pET100 è stata condotta seguendo le indicazioni del produttore (Invitrogen). Il plasmide pET100 è predigerito con l'enzima di restrizione topoisomerasi I, che riconosce il sito di taglio 5'-CCCTT | TTCCC-3'. La miscela di ligazione, contenente 1 µl di plasmide pET100, 1 µl di Soluzione Salina 10X e 4 µl di inserto 1 ng/µl, è stata lasciata a temperatura ambiente per 10 minuti e poi conservata a -20°C. I prodotti di ligazione sono stati denominati pET100:PINA e pET100:PINB.

Le reazioni di ligazione per il clonaggio nel vettore di espressione pGEX sono state condotte utilizzando diversi rapporti tra la concentrazione molare dell'inserto e quella del vettore (3:1 e 5:1). Le reazioni sono state effettuate in una soluzione contenente l'opportuna concentrazione di frammento e vettore, 4 µl del tampone di diluizione 5X, 10 µl del tampone 2X per la T4 DNA ligasi, 0.1 U di T4 DNA ligasi (Roche) e acqua fino al volume finale di 20 µl. La miscela di ligazione è stata incubata per 10 minuti a 16°C e poi conservata a -20°C. I prodotti di ligazione sono stati individuati come pGEX:PINA e pGEX:PINB.

2.15. Trasformazione con il vettore pET100:PIN

La trasformazione di cellule competenti con pET100:PIN è stata condotta con il metodo dello shock termico. A 50 µl di cellule competenti One Shot® TOP10 sono stati aggiunti 5 µl della soluzione contenente il plasmide ricombinante (pET100:PIN). Il tutto è stato incubato per 30 minuti su ghiaccio. Successivamente il campione è stato posto per 30 secondi a 42°C ed immediatamente trasferito su ghiaccio. Alla miscela sono stati aggiunti 250 µl di mezzo S.O.C. (2% Triptone, 0.5% Estratto di lievito, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucosio). Successivamente è stata effettuata un'incubazione in agitazione a 37°C per 1 ora. Un'aliquota (50, 100 e 150 µl) delle cellule sottoposte a trasformazione è stata spatolata su piastre di LB-agar (Difco) contenenti 100 µg/ml di ampicillina, successivamente incubate overnight a 37°C.

L'inserzione dei geni *pina* e *pinb* è stata verificata mediante una PCR effettuata stemperando direttamente nella miscela di reazione una colonia cresciuta su terreno selettivo (colony PCR). Sono stati utilizzati a tale scopo il primer forward specifico per il promotore del fago T7 (Invitrogen) ed il primer reverse di *pina* o *pinb*. La presenza dell'inserito ed il suo corretto orientamento sono stati analizzati mediante sequenziamento. I cloni positivi, esprimenti cioè PINA o PINB fusi al tag N-terminale 6xHys, sono stati propagati in LB brodo (Difco) supplementato con ampicillina (100 µg/ml), overnight a 37°C.

Le cellule competenti BL21* e pLysS sono state trasformate con i plasmidi pET100:PINA o pET100:PINB (20 ng di plasmide per le BL21* e 3 µg per le pLysS). I trasformanti positivi sono stati analizzati mediante colony PCR. Le cellule BL21* trasformate sono state incubate in agitazione a 37°C in LB brodo arricchito con 1% glucosio e 200 µg/ml carbenicillina. Le cellule pLysS trasformate sono state incubate in agitazione a 37°C in LB brodo arricchito con 1% glucosio, 100 µg/ml di ampicillina e 34 µg/ml cloramfenicolo.

2.16. Trasformazione con il vettore pGEX:PIN

Il prodotto ottenuto dalla reazione di ligazione (pGEX:PIN) è stato introdotto in cellule competenti di *E. coli* DH5α mediante il metodo dello shock termico. A 20 µl di cellule competenti DH5α sono stati aggiunti 3 µl della soluzione contenente il plasmide ricombinante (pET100:PIN). Il tutto è stato incubato per 30 minuti su ghiaccio. Successivamente il campione è stato posto per 30 secondi a 42°C ed immediatamente trasferito su ghiaccio. Alla miscela sono stati aggiunti 500 µl di LB brodo (Difco) e successivamente è stata effettuata un'incubazione in agitazione (300 rpm) a 37°C per 1 ora. Un'aliquota (150 µl) delle cellule sottoposte a trasformazione è stata spatolata su piastre di LB-agar (Difco) contenenti 100 µg/ml di ampicillina, successivamente incubate overnight a 37°C.

L'inserzione dei geni *pina* e *pinb* è stata verificata mediante colony PCR. Sono stati utilizzati a tale scopo i primer specifici del vettore pGEX forniti dall'Amersham Biosciences. La presenza dell'inserito e il suo corretto orientamento sono stati analizzati mediante sequenziamento. I cloni positivi, esprimenti cioè PINA o PINB fusi alla GST (GST-PINA o GST-PINB) ed aventi il sito di riconoscimento per la proteasi trombina fra la GST e la PIN, sono stati in LB brodo (Difco) supplementato con ampicillina (100 µg/ml), overnight in agitazione a 37°C.

Le cellule competenti ORIGAMI™ B sono state trasformate con i plasmidi pGEX:PINA e pGEX:PINB con il metodo dello shock termico. I cloni positivi sono stati propagati in LB brodo (Difco) supplementato con ampicillina (100 µg/ml), kanamicina (15 µg/ml) e tetraciclina (12,5 µg/ml), overnight in agitazione a 37°C.

2.17. Estrazione del DNA plasmidico

L'estrazione plasmidica è stata realizzata tramite il QIAprep-spin Plasmid Kit, che si basa sul metodo della lisi alcalina e sull'adsorbimento del DNA su silice, in presenza di un'alta concentrazione di sali. Il pellet, ottenuto per centrifugazione a 13000 rpm per 5 min da 4 ml di brodocoltura, è stato risospeso in 250 µl di tampone P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.00, 10mM EDTA, 100µg/ml RNasi A), e poi addizionato di 250 µl di

tampone di lisi P2 (200 mM NaOH, SDS 1%). Dopo incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 350 µl del tampone N3. Il campione è stato agitato rapidamente per 4-5 volte. La miscela ottenuta è stata incubata 5 min su ghiaccio e poi centrifugata a 13000 rpm per 10 min. Il surnatante è stato quindi trasferito in una colonna QIAprep-spin, che, dopo centrifugazione per 1 min a 13000 rpm, ha permesso l'adsorbimento del DNA alla resina. La colonna è stata lavata, in due fasi successive, con 500 µl di tampone PB e 750 µl di tampone PE, allontanando il liquido sempre mediante centrifugazione. Una seconda centrifugazione di 2 minuti è stata effettuata per eliminare eventuali residui di etanolo. Il DNA è stato quindi eluito aggiungendo 50 µl di acqua tridistillata DNasi e RNasi free e conservato a -20°C.

2.18. Espressione delle Hys-PIN e delle GST-PIN

Una serie di esperimenti pilota sono stati effettuati per determinare le migliori condizioni di espressione delle Hys-PIN (in BL21* o pLysS) e delle GST-PIN (in DH5α o ORIGAMITM B), e monitorare la produzione delle proteine di interesse a diversi tempi di incubazione delle cellule batteriche trasformate.

2.18.1. Preinoculo

Una singola colonia batterica trasformata è stata propagata in 50 ml di terreno LB contenente gli opportuni antibiotici e incubata in agitazione (250 rpm) overnight a 37°C.

2.18.2. Inoculo ed induzione

Il preinoculo è stato addizionato ad un dato volume di terreno LB, arricchito con gli opportuni antibiotici, in modo da ottenere una assorbanza iniziale (OD_{600}) pari a 0.05. L'inoculo è stato incubato a due diverse temperature (28-37°C). Dalla coltura sono stati prelevati, in tempi successivi, campioni di 1 ml di cui è stata misurata l'assorbanza. A valori di assorbanza ≥ 0.3 , la coltura è stata indotta aggiungendo IPTG a diverse concentrazioni (0.1-0.5-1mM).

2.18.3. Cinetica di accumulo della proteina eterologa

Al fine di determinare la cinetica di accumulo delle proteine eterologhe espresse, è stato prelevato 1 ml di coltura batterica a 0, 1, 2, 3, 4 e 16 ore dall'aggiunta di IPTG al mezzo di coltura (1 ml di coltura batterica non indotta è stata utilizzata come controllo). Di ciascuna aliquota è stata misurata l'assorbanza a 600 nm; quindi ognuna di esse è stata centrifugata a 12000 rpm per 5 minuti a 4°C e uguali quantità (stessi OD_{600}) di batteri non indotti e indotti sono state caricate su SDS-PAGE per l'analisi dell'espressione proteica.

2.19. Estrazione delle proteine solubili ed insolubili

Una volta stabilite le condizioni ottimali di espressione, i batteri sono stati indotti su scala maggiore (1 litro di coltura). Per ottenere le frazioni solubili ed insolubili la brodocoltura è stata prima centrifugata a 4000 rpm per 20 minuti a 4°C e successivamente il pellet è stato risospeso in 10 ml di tampone A (1% Triton X-100, 2 mM PMSF, 1x di cocktail di inibitori delle proteasi, in PBS). Il campione è stato sottoposto a sonicazione (5 volte per 20 secondi con intervalli da 15 secondi) e poi centrifugato a 10000 rpm per 30 minuti a 4°C: le proteine insolubili contenute nel pellet, sono state separate da quelle solubili contenute nel surnatante. Il pellet è stato risospeso in 10 ml di tampone A e uguali quantità di surnatante e pellet sono state analizzate su SDS-PAGE.

2.20. Purificazione e analisi delle Hys-PIN

Le puroindoline ricombinanti sono state purificate mediante l'utilizzo di Ni-NTA spin column come da manuale (Sigma). L'eluizione è stata condotta in condizioni denaturanti a pH 5.3 e le frazioni ottenute sono state analizzate mediante SDS-PAGE. Le frazioni contenenti le Hys-PIN sono state raggruppate insieme e trattate per la procedura di refolding.

2.21. Purificazione e analisi delle GST-PIN

Le GST-PIN sono state purificate dalla frazione solubile in batch, utilizzando Glutathione immobilizzato (Glutathione Sepharose 4B), come descritto nel manuale (Amersham Biosciences). La frazione solubile (prodotta da un litro di coltura batterica indotta) è stata prima incubata con la resina (500 µl) per 2 ore a 4°C, poi centrifugata a 4000 rpm per 5 minuti a 4°C ed infine incubata per 20-30-40 minuti a temperatura ambiente con il tampone di eluizione (50mM Tris-HCl, 10mM glutathione ridotto, pH 8.0). Sono state analizzate diverse condizioni per ottimizzare la purificazione. In particolare, sono stati variati i tempi di incubazione con il tampone di eluizione (da un'ora ad overnight), il volume del tampone di eluizione (da 1 a 3 volumi) e la sua composizione. In particolare, è stata aumentata la concentrazione di glutathione (20-30mM), la forza ionica (100mM Tris-HCl) ed è stato aggiunto un detergente non-ionico (0.1% Triton X-100). Proteine non legate alla resina, legate ed eluite sono state analizzate mediante SDS-PAGE.

Per purificare le GST-PIN dalla frazione insolubile sono stati testati diversi tamponi di solubilizzazione e diversi tempi di incubazione. Le soluzioni denaturanti utilizzate sono state: tampone Urea 8 M, tampone GuHCl (8 M GuHCl, 5 mM DTT, 5 mM EDTA, 50 mM Tris HCl pH 7.4), tampone Urea/Triton (Urea 6M, 1% Triton X-100). Esse sono state utilizzate da sole o in combinazione. Il pellet ottenuto da 1 litro di coltura batterica processata è stato prima lavato 7-8 volte con 10 ml di tampone di lavaggio (1% Triton X-100 in PBS), e poi incubato con 3 ml di soluzione solubilizzante. Ogni ora 20 µl di ogni campione sono stati centrifugati a 10000 rpm per 45 minuti a 4°C e uguali quantità di surnatante (proteine solubili) e pellet (proteine insolubili) sono state analizzate su SDS-PAGE.

2.22. Procedura di refolding e taglio del tag

Sono stati condotti diversi test per mettere a punto le condizioni migliori per un corretto refolding. In un set di esperimenti il refolding è stato condotto dializzando le proteine solubili overnight a 4°C contro il tampone #11 e il tampone 16# (Armstrong et al., 1999). In un altro set di esperimenti le proteine solubilizzate sono state dializzate contro tamponi contenenti concentrazioni decrescenti di agente denaturante e concentrazioni crescenti di glicerolo. Le proteine dializzate sono state poi centrifugate a 10000 rpm per 30 minuti a 4°C per permettere la precipitazione di proteine non correttamente ripiegate e analizzate mediante SDS-PAGE.

Le Hys-PIN sottoposte al refolding sono state trattate con enterochinasi bovina (EKMax, Invitrogen) per eliminare il tag (Invitrogen handbook) e analizzate mediante SDS-PAGE.

Le GST-PIN sottoposte al refolding sono state prima legate alla resina Glutathione Sepharose 4B e poi tagliate con la trombina (25U/litro di coltura batterica indotta) (Amersham handbook). Dopo 3, 6, 16 ore di incubazione con l'enzima, 20 µl di campione sono stati prelevati e centrifugati. Le proteine tagliate (surnatante) e quelle ancora legate alla resina (pellet) sono state caricate su SDS-PAGE. La trombina e la GST libera sono state rimosse dal campione caricando il prodotto prima sulla resina HiTrap Benzimidine (Amersham Biosciences) e poi sulla Glutathione Sepharose 4B, recuperando da ogni colonna il campione non legato.

2.23. Produzione di anticorpi contro le PIN ricombinanti (rPIN)

Sono stati prodotti anticorpi policlonali rivolti contro le proteine ricombinanti (rPINA ed rPINB) in ratti (RatαrPINA, RatαrPINB). Gli animali hanno ricevuto 4 iniezioni intraperitoneali ad intervalli di 2 settimane. Alla prima iniezione gli animali sono stati immunizzati con 50 µg di proteina ricombinante emulsionata all'adiuvante completo di Freund. Le successive iniezioni sono state condotte utilizzando l'adiuvante incompleto di Freund. Il siero è stato raccolto 2 settimane dopo l'ultima immunizzazione e analizzato con un test citofluorimetrico. Il test è stato condotto come descritto nel paragrafo 2.7. Come antigene sono stati utilizzati 1 µg di rPIN o 1 µg di PIN purificate mediante immunoassorbente. Gli antisieri da testare sono stati utilizzati alla diluizione 1:100.

2.24. SDS-PAGE

L'SDS-PAGE è stata condotta nell'apparecchio *Mini-Protean II Cell* (Bio-Rad). I gel, di 0,75 mm di spessore, erano composti da: percentuale di monomeri (T= % acrilammide + % bis-acrilammide) pari al 15% (o al 10%) e di cross-linking [C=100 x (grammi di bis-acrilammide/grammi di acrilammide + grammi di bis-acrilammide)] pari allo 0.5%, 0.36 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS. Il gel spaziatore era composto da: percentuale di monomeri pari al 3,75% e di cross-linking pari al 2,67%, 0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS. La polimerizzazione dell'acrilammide è stata indotta utilizzando N,N,N',N'-tetrametilendiammina (TEMED) alla concentrazione finale dello 0.2% ed ammonio persolfato (APS) allo 0.1 %. La corsa è stata condotta ad un voltaggio costante (200 Volts) a temperatura ambiente, in un tampone contenente

0.18 M glicina, 0.025 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1 % SDS. I gel sono stati colorati con Blu Comassie e analizzati con il Gel Doc 2000 (Biorad). La concentrazione proteica è stata stimata utilizzando il software Quantity One (Biorad).

2.25. Western Blotting

Le analisi di Western Blotting sono state condotte al fine di determinare l'identità delle proteine eterologhe espresse.

Il gel SDS-PAGE, preparato secondo quanto riportato nel paragrafo precedente, è stato trasferito su una membrana PVDF (*Immuno-Blot PVDF membrane* 0.2 μ m, Bio-Rad) utilizzando il *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). Il gel è stato trasferito sulla membrana in un tampone contenente 48 mM Tris, 39 mM Glicina, 1.3 mM SDS per 1 ora a 4°C, ad un voltaggio costante di 100 V. Terminato il trasferimento, la membrana PVDF è stata posta nella soluzione di bloccaggio (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 5% latte liofilizzato) per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente. La membrana è stata lavata con una soluzione costituita da 10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0.2% Tween-20 ed incubata con un anticorpo primario per tutta la notte in agitazione lenta. La membrana è stata successivamente lavata ed incubata con l'anticorpo secondario per 1 ora. Per il rilevamento è stato utilizzato il kit di chemiluminescenza della Santa Cruz Biotechnology.

Gli anticorpi utilizzati e le diluizioni sono indicate di seguito: mouse α XPress (Invitrogen) 1:2500, Rat α PIN 1:1000, Mouse α GST 1:1500, Rat α rPIN 1:1000, peroxidase-conjugated Goat α Rat IgG (Roche Molecular Biochemicals) 1:20000, peroxidase-conjugated Goat α Mouse IgG (Roche Molecular Biochemicals) 1:2500. tutti gli anticorpi sono stati diluiti in PBSTM (0.5% Tween 20, 5% latte in polvere in PBS).

2.26. Test di attività antimicrobica

Il ceppo batterico da analizzare è stato inoculato in Bacto Peptone Water al 2%, fino al raggiungimento della fase esponenziale. La concentrazione cellulare è stata calcolata considerando 3.8×10^8 CFU/ml = 1 U, A_{600} . La sospensione cellulare è stata diluita in Bacto Peptone Water al 2%, ottenendo una concentrazione pari a 2×10^6 CFU/ml. 100 μ l di tale inoculo sono stati posti in una piastra di polistirene a 96 pozzetti. Una miscela di puroindoline a e b a diverse concentrazioni, è stata aggiunta in ogni pozzetto. Il saggio è stato condotto incubando i campioni di *S. aureus*, *E. coli* e *S. epidermidis* per 16 ore a 37°C; per gli altri ceppi batterici in esame il saggio è stato condotto per 36 ore a 30°C. Cambiamenti nella torbidità del mezzo di crescita dovuti alla attività delle proteine, sono stati rilevati effettuando una lettura spettrofotometrica a 540 nm. La percentuale di inibizione delle puroindoline è stata calcolata usando la seguente equazione: % inibizione = [(OD popolazione controllo - OD popolazione trattata)/OD popolazione controllo]x100.

Il controllo negativo è stato effettuato utilizzando del tampone fostato (PBS), mentre il controllo positivo è stato eseguito aggiungendo l'antibiotico appropriato.

E' stata valutata la minima concentrazione inibente (MIC) di PIN necessaria a inibire totalmente la crescita dei ceppi in esame. Per lo *S. epidermidis* invece è stato ottenuto il valore che ne inibisce la crescita del 90% (MIC₉₀).

2.27. Conta in piastra

L'attività antibatterica delle rPIN è stata quantificata eseguendo anche dei "killing test" incubando 2×10^7 batteri risospesi in PBS, in presenza o meno di rPINA (125 µg/ml) o rPINB (40 µg/ml). Il controllo positivo è stato condotto aggiungendo l'appropriato antibiotico, mentre il controllo negativo aggiungendo acqua. I campioni diluiti serialmente sono stati piastrati su triptone soia agar (Oxoid, Basingstoke Hampshire, UK) in seguito a incubazioni di 15 minuti, 3, 6, 24 ore (Herigstad et al., 2001).

2.28. Analisi della vitalità batterica mediante microscopia a fluorescenza

L'attività antimicrobica delle PIN e delle rPIN è stata testata con la microscopia a fluorescenza su ceppi di *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus epidermidis*. Lo *S. epidermidis* è stato isolato da una ferita infetta e la specie è stata confermata dalla PCR specie-specifica così come descritto in letteratura (Martineau et al. 1996). La percentuale di vitalità delle popolazioni batteriche è stata stimata utilizzando il Live/Dead® BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes). Il kit consiste nella doppia marcatura delle cellule batteriche con SYTO9 e Ioduro di Propidio. Entrambi i coloranti si legano agli acidi nucleici. Il SYTO9 è permeabile alla membrana cellulare, e quindi colora le cellule vive; lo Ioduro di Propidio invece non è permeabile e colora gli acidi nucleici solo se la membrana è danneggiata.

In breve, 50 µl di PBS contenenti 2×10^7 batteri/ml sono stati incubati con 5 µl di PIN all'opportuna concentrazione (Mauriello et al. 2005). Batteri vivi e morti sono stati contati utilizzando un microscopio a fluorescenza Leica DM RA/RXA con una lampada UV e un obiettivo 100X.

L'attività antibatterica delle rPIN è stata condotta utilizzando due diverse marcature. In particolare 2×10^7 batteri/ml risospesi in PBS sono stati trattati con la concentrazione appropriata di PINA e rPINB (1-40 µg/ml) per 1 ora. Il controllo negativo è stato effettuato utilizzando del tampone fostato (PBS), mentre il controllo positivo è stato eseguito aggiungendo l'antibiotico appropriato. Le cellule sono state poi marcate con carbossifluoresceina (CFDA) e DAPI (Sigma, St. Louis Missouri, USA) rispettivamente come già descritto in precedenza (Morono et al., 2004). Il CFDA è un colorante vitale, che rilascia fluorescenza solo in cellule vive in cui è ancora presente l'attività esterasica capace di metabolizzare il composto. Il DAPI invece è un marcatore che si lega agli acidi nucleici della cellula, indifferentemente se essa sia viva o morta. Le cellule marcate sono state analizzate in seguito ad eccitazione a 450-490nm (per il CFDA) o 340-380 nm (per il DAPI). Sono state scattate le microfotografie con una fotocamera Leica DC 300F. Il tempo di esposizione di 0.2 secondi è stato utilizzato per tutti i campioni.

2.29. Analisi della vitalità batterica mediante citofluorimetria

La vitalità dello *S. epidermidis* dopo il trattamento con le rPIN è stata determinata anche mediante analisi citofluorimetrica. 2×10^7 batteri/ml sono stati lavati con PBS, incubati con rPINA o rPINB per 2 ore e poi marcati con 30 nM di SYTO9 e 15 µM di Ioduro di Propidio (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Dopo 15 minuti di incubazione al buio, i campioni sono stati analizzati al citofluorimetro. La curva

standard è stata costruita come suggerito dal produttore (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA).

2.30. Saggio di attività emolitica delle rPIN

Le puroindoline ricombinanti sono state analizzate per la loro attività emolitica su eritrociti di ratto come descritto in letteratura (Jing et al., 2003). Gli eritrociti sono stati isolati dal sangue (Shipkova et al., 2004) lavati 3 volte con PBS, e aliquote contenenti 10^7 cellule/ml sono state incubate con rPINA (10-150 $\mu\text{g/ml}$) o rPINB (2-50 $\mu\text{g/ml}$) per 30 minuti a 37°C in agitazione. I campioni sono stati poi centrifugati ed è stata misurata l'assorbanza del surnatante a 540 nm. Nessuna emolisi e l'emolisi totale sono state ottenute trattando gli eritrociti rispettivamente con PBS e con 1% Triton X-100.

2.31. Saggio di induzione di accumulo di nitriti su linee cellulari di macrofagi trattati con le rPIN

La linea cellulare di macrofagi murini J774 è stata coltivata in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium) supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FCS) (Invitrogen, Carlsbad, California, USA), 100 IU/ml di penicillina e 100 IU/ml di streptomicina (Cardile et al., 2004). Le cellule sono state poste in una piastra a 96 pozzetti (10^5 cellule/pozzetto) e poi incubate (37°C , 5% CO_2) per 3 ore in modo da permetterne l'aderenza. Successivamente le cellule sono state trattate con rPINA (10-150 $\mu\text{g/ml}$) o rPINB (2-50 $\mu\text{g/ml}$) per 24, 48 e 72 ore. Il controllo positivo è stato condotto utilizzando 1 $\mu\text{g/ml}$ di LPS. L'accumulo di nitriti (NO_2^- , nmol/ 10^6 cellule) nel mezzo di coltura è stato determinato dalla reazione di Griess (Cardile et al., 2004).

La vitalità cellulare è stata analizzata mediante un test colorimetrico che permette di stimare il numero delle cellule aventi attività mitocondriale (test MTT). Il test MTT è basato su un indicatore metabolico, il sale solubile di tetrazolo che, nelle cellule vitali, è ridotto nel mitocondrio ad opera di enzimi deidrogenasi attivi a formare un cristallo insolubile in acqua di color viola. I cristalli solubilizzati sono quantificati con metodo colorimetrico alla lunghezza d'onda di 570 nm (assorbanza del colorante ridotto) con correzione di background a 690 nm (D'acquisto et al., 2001).

2.32. Esperimenti di infezione *in vitro* con *S. epidermidis* e analisi della vitalità dei batteri intracellulari dopo il trattamento con le rPIN

Le cellule J774 sono state distribuite in una piastra da 24 pozzetti (10^5 cellule/pozzetto) ed incubate overnight (37°C , 5% CO_2) in DMEM addizionato con 5% FCS, penicillina (100 IU/ml) e streptomicina (100 IU/ml). I pozzetti sono poi stati lavati con DMEM per rimuovere gli antibiotici e le cellule che non hanno aderito. Sono stati aggiunti per ogni pozzetto 500 μl di DMEM addizionato con il 5% di FCS e le cellule sono state poi infettate con *S. epidermidis* (10^4 batteri). La piastra è stata poi centrifugata (750 g per 5 minuti) in modo da facilitare il contatto delle cellule con i batteri e poi incubate per 30 minuti a 37°C con il 5% di CO_2 . I batteri extracellulari sono stati eliminati con gentamicina (50 $\mu\text{g/pozzetto}$) per 1 ora a 37°C con il 5% di

CO₂. I macrofagi sono stati lavati con 500 µl di DMEM addizionato con gentamicina (50 ng/pozzetto) ed incubati con rPINA o rPINB (1-3 µg/pozzetto). In seguito ad incubazione (3-24 ore), le cellule sono state lisate con 50 µl di 0.50% Tween 20, diluite serialmente e piastrate per contare le CFU. L'esperimento è stato condotto in triplicato. I batteri extracellulari (cresciuti senza le cellule della linea J774) trattati e non trattati con le rPIN sono stati utilizzati come controllo.

2.33. Esperimenti di infezione *in vivo* con *S. aureus* e analisi dell'infezione dopo il trattamento con le rPIN

Gli esperimenti sono stati condotti su topi maschi di razza albina di 6-10 settimane del ceppo CD1, del peso di 25-35 grammi. Gli animali sono stati stabulati a temperatura costante ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), con cicli di 12 ore luce-buio e con libero accesso all'acqua e al cibo.

I topi sono stati infettati con *S. aureus* e divisi in 2 gruppi: trattati e controllo (3 animali per ciascun gruppo). Agli animali sottoposti al trattamento sono state somministrate intravena differenti dosi di rPIN sciolte in una soluzione di PBS pH 7.2 (100 µl, 50 mg/ml), filtro-sterilizzata (0.22 µm Millex filters - Millipore, Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland); gli animali di controllo hanno ricevuto il solo veicolo.

La via di somministrazione e la dose ottimale di *S. aureus* sono state scelte in seguito ad esperimenti preliminari, partendo da dati riportati in letteratura. Tali esperimenti hanno consentito di definire la dose capace di indurre tossicità ma non la morte degli animali successivamente alla somministrazione del batterio.

Per determinare la carica batterica *in vivo*, i reni sono stati escissi dall'animale, pesati, omogeneizzati in PBS, diluiti serialmente e successivamente piastrati su mezzo selettivo Baird Parker agar. I risultati sono stati espressi come cfu/g. Gli esperimenti sono stati condotti in accordo con l'Animal Care Committee dell'Università di Napoli.

2.34. Misura dell'espressione delle citochine a seguito del trattamento con le rPIN di topi infetti con *S. aureus*

I livelli di IL-6 and TNF-α nel plasma sono stati determinati tramite ELISA, utilizzando il Cytoscreen immunoassay kits (BioSource International), secondo quanto descritto nel manuale d'istruzione. La sensibilità del saggio è stata pari a 5 pg/ml per IL-6 e 10 pg/ml per TNF-α.

I livelli di IL-6 and TNF-α nei tessuti sono stati determinati tramite Real-Time RT-PCR. L'RNA è stato estratto nella soluzione Trizma (Promega, Madison, WI, USA) secondo quanto descritto nel manuale d'istruzione e trattato con RNase free DNase (Acros Organics, NJ, USA) a 37°C per 30 min e 70°C per 10 min. Oligo d(T)18 (5 mM) sono stati aggiunti ai campioni di RNA (17 µl), incubati a 37°C per 5 min e successivamente raffreddati su ghiaccio per 5 min. L'RNA è stato retrotrascritto grazie all'uso dell'Im Prom II reverse Transcriptase, secondo quanto descritto nel manuale d'istruzione. Il cDNA è stato sottoposto a Real time PCR, utilizzando Brilliant-SYBER green master mix (Stratagene) and a Biorad i-cycler (Biorad). Le reazioni sono state condotte in triplicato in un volume finale di 25 µl con il seguente

profilo termico: 10 min a 95°C; 45 cicli, ciascuno di 15 secondi a 95°C e 45 secondi a 60°C. I primers specifici utilizzati per amplificare le citochine sono: IL-6 forward 5'-AAAGAGTTGTGCAATGGCAATT-3'; IL-6 reverse 5'-CAGTTTGGTAGCATCCATCAT-3'; TNF- α forward 5'-TCTCAGCCTCTTCTCATTCT-3'; TNF- α reverse 5'-GTCTGGGCCATAGAACTGATG-3'. Il gene housekeeping usato come controllo interno è il GAPDH, amplificato con i primer: GAPDH forward 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'; GAPDH reverse 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3' (Palliser et al., 2006). La specificità è stata verificata attraverso l'analisi della melt curve e i prodotti risultanti dall'amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio. I livelli di espressione relativa sono stati calcolati con il metodo di comparazione CT.

2.35. Analisi degli antigeni delle cellule T

I livelli di espressione degli antigeni delle cellule T CD8a, CD8b, CD4, CD25 e CD45 T cell durante il corso dell'infezione da *S. aureus* sono stati determinati con il citofluorimetro usando i seguenti anticorpi monoclonali: PE Anti-Mouse CD8a, PE Anti-Mouse CD8b (Cederlane, Ontario Canada), PE Anti-Mouse CD4, PE Anti-Mouse CD25 and RPE-Cy5 Anti-Mouse CD45 (Becton-Dickinson, USA). Il sangue periferico è stato prelevato dalla vena caudale. Il sangue (50 μ l) è stato lisato con 700 μ l di erythrocyte lysis buffer contenente cloruro di ammonio allo 0.8%. La miscela è stata incubata 10 minuti a 37°C, centrifugata e il surnatante è stato eliminato. Successivamente, le cellule sono state lavate due volte in PBS, incubate con l'anticorpo opportunamente diluito (100 μ l) a temperatura ambiente e al buio per 90 minuti. Tutti gli antibiotici sono stati usati alla quantità di saturazione. Le cellule marcate sono state lavate due volte in PBS e analizzate al citofluorimetro Coulter EPICS Elite, valutando almeno 10000 eventi.

2.36. Misura dell'infiammazione

I livelli della proteina C reattiva (CRP) e del fibrinogeno nel plasma sono stati misurati utilizzando un kit per ELISA (latroset Fbg; latron Laboratory).

2.37. Analisi statistica

I dati sono espressi come media \pm deviazione standard (SD) di esperimenti condotti in triplicato. Differenze tra i gruppi di controllo e quelli sperimentali sono stati analizzati con il test della *t* di Student.

3. RISULTATI

3.1. Immunolocalizzazione di PINA e PINB nella cariosside

Esperimenti preliminari di immunomarcatura sono stati condotti per stabilire la specificità degli anticorpi prodotti nel riconoscere unicamente le puroindoline tra tutte le proteine della cariosside, e nel distinguere tra i due polipeptidi che sono simili tra loro al 55%. A tale scopo anticorpi α PINA sono stati utilizzati per colorare sezioni di cultivar Sibilla PINA nulle, mentre anticorpi α PINB sono stati utilizzati per colorare sezioni di cultivar Canadian red PINB nulle. Come si può vedere dalla Figura 3B, gli anticorpi α PINA non cross reagiscono con nessun'altra proteina (inclusa PINB) della cariosside della cultivar Sibilla, confermando la loro ipotizzata specificità. Gli stessi risultati si sono ottenuti quando anticorpi α PINB sono stati utilizzati su sezioni di Canadian red. Una volta valutata l'alta specificità dei nostri antisieri, è stata studiata la localizzazione nello strato aleuronico e nell'endosperma amilifero su sezioni di cariossidi mature. In tutte le cultivar analizzate le puroindoline sono localizzate sulla superficie dei granuli d'amido (segnalato in figura con una punta di freccia), sulla superficie della membrana plasmatica (segnalato in figura con una freccia) e negli spazi intercellulari (segnalato in figura con un asterisco) sia delle cellule dello strato aleuronico che di quelle nell'endosperma (Figure 4 e 5). Nelle cultivar soft analizzate il segnale delle PIN appare più intenso nello strato aleuronico che nell'endosperma (Figura 4). Le due proteine sono entrambe abbondanti e sempre co-localizzate in questi compartimenti. Nello strato aleuronico PINA e PINB sono state trovate per lo più associate ai granuli d'amido e alla membrana plasmatica, lungo la quale esse formano uno strato uniforme. Esse sono anche abbondantemente immunolocalizzate negli spazi intercellulari (Figura 4A, B, C, D). Le puroindoline sono principalmente legate ai granuli d'amido e alla membrana plasmatica anche nell'endosperma amilifero, mentre sono trovate meno frequentemente nella matrice proteica (Figura 4E, F). Gli esperimenti di immunofluorescenza sono stati condotti con anticorpi α PINA ed α PINB anche su cultivar che non esprimono una delle due puroindoline. Nella cultivar Sibilla (PINA nulla) è stato possibile identificare solamente il segnale rosso, dovuto alla presenza di PINB (Figura 5A, B). La puroindolina b è stata localizzata in concentrazioni maggiori nello strato aleuronico che nell'endosperma amilifero. In entrambi i compartimenti PINB si localizza sulla superficie dei granuli d'amido e sulla membrana cellulare. Nella cultivar Canadian red, a causa della mancanza di PINB, è stato possibile vedere solo il segnale verde, dovuto alla presenza di PINA (Figura 5C, D). Anche in questa cultivar, la sola puroindolina presente è più abbondante nelle cellule dell'aleurone, in associazione con i granuli d'amido e la membrana plasmatica.

3.2. Identificazione delle puroindoline nelle preparazioni industriali

Test citofluorimetrici sono stati condotti su alcuni prodotti da forno, per identificare la presenza delle PIN anche dopo cottura e conservazione. Sebbene sia stato possibile identificare entrambe le puroindoline in tutti i prodotti da forno analizzati, la loro concentrazione variava fra i diversi alimenti, probabilmente a causa della diversa

tipologia di farina utilizzata per ogni prodotto. Tutti gli snack ed i biscotti testati, che solitamente sono prodotti con farina di frumento tenero soft, hanno mostrato un più alto contenuto di puroindoline (corrispondente ad una più alta mediana di fluorescenza, Figura 6A) rispetto ai campioni di pane in cassetta, solitamente prodotti utilizzando frumento tenero hard (Figura 6B). In particolare snack e biscotti hanno mostrato valori di mediana compresi fra 250 e 410, mentre i campioni di pane in cassetta hanno mostrato valori di mediana compresi tra 20 e 150. Come aspettato, nessuna traccia di puroindoline è stata rilevata in campioni di pane di frumento duro.

3.3. Attività antibatterica delle puroindoline native

PINA e PINB sono state in grado di inibire la crescita di tutti i batteri analizzati. Le MIC per ogni batterio sono riportate in Tabella 3. I risultati indicano che PINA e PINB richiedono la stessa concentrazione per l'inibizione completa. A concentrazioni più basse della MIC le due puroindoline hanno mostrato un diverso comportamento. Come si può vedere dalla Tabella 4 (attività inibente nei confronti di *E. coli*), ad 1/3 del valore della MIC PINA mostra una lieve attività antimicrobica (2%), mentre a 2/3 del valore della MIC questa attività aumenta considerevolmente (84%). Al contrario, ad 1/3 del valore della MIC PINB si comporta già come un potente inibitore (82%), e la percentuale di inibizione non aumenta in maniera sostanziale al crescere della concentrazione della proteina (89% a 2/3 del valore della MIC).

Quando PINB è stata aggiunta in piccole quantità (considerandola in tal modo come proteina subinibitoria) a PINA ad 1/3 del valore della MIC, si è notato un notevole incremento della tossicità (dal 2% al 14% e 89% con l'aggiunta di 1 e 5 µg/ml di PINB, rispettivamente). Quando la stessa quantità di PINB è stata aggiunta a PINA a 2/3 del valore della MIC, si è notato solo un piccolo incremento nell'inibizione, ma non si è mai raggiunta l'inibizione completa (Tabella 4).

Aggiungendo quantità subinibitorie di PINA a PINB ad 1/3 del valore della MIC l'inibizione non ha mostrato grossi cambiamenti; quando PINA è stata aggiunta a PINB a 2/3 del valore della MIC, è stata osservata un'inibizione del 100% già con 1 µg/ml (Tabella 4). Inoltre, è stata valutata la capacità della putativa proteina subinibitoria di abbassare il valore della MIC della proteina principale, calcolando il fattore di sinergia, come descritto da altri autori (Dubreil et al., 1998). Nella Tabella 5 è possibile osservare i risultati ottenuti effettuando il test su *E. coli* e *P. syringae*. Come illustrato, mentre la MIC di PINA non cambiava sostanzialmente con l'aggiunta di PINB, la MIC di PINB, invece, diminuiva di 1.5-2.5 volte a seguito dell'aggiunta di PINA. Risultati simili sono stati ottenuti per tutti i batteri testati.

L'attività antimicrobica delle PIN è stata confermata con il metodo di diffusione su agar. Alla più bassa concentrazione testata (1/3 del valore della MIC) è stata osservata solo un'inibizione parziale. Alla più alta concentrazione testata (corrispondente alla MIC) l'attività delle PIN è stata comparabile a quella dell'antibiotico utilizzato come controllo positivo (Figura 7B).

Le puroindoline sono state saggiate anche per la loro attività battericida, a concentrazioni variabili fra il valore della MIC e 10 volte la MIC. In Figura 7A è rappresentata la *killing curve* di PINA su *E. coli*; come mostrato, al valore della MIC PINA causa solo un debole decremento della popolazione batterica. Il numero di batteri viene ridotto a meno di 10 CFU/ml solo con una concentrazione 10X del valore della MIC e dopo 24 ore di incubazione. PINB dà lo stesso profilo di PINA.

Anche per gli altri batteri testati è stato necessario utilizzare una concentrazione di PIN pari a 10X la MIC per uccidere completamente i batteri.

3.4. Espressione di Hys-PINA ed Hys-PINB nelle cellule pLysS e BL21 *

Le puroindoline ricombinanti aventi la coda di 6xHys, denominate Hys-PINA ed Hys-PINB, sono state espresse come proteine di 18-kDa in due differenti ospiti: le cellule di *E. coli* pLysS e BL21*. Poichè le puroindoline hanno mostrato una forte attività antibatterica, le pLysS sono state scelte per la loro capacità di esprimere proteine tossiche per l'ospite. I risultati ottenuti hanno dimostrato che attività antimicrobica delle PIN non influenza la crescita batterica dell'ospite utilizzato: sia BL21* che pLysS crescevano allo stesso modo mostrando valori di OD paragonabili, agli stessi tempi di incubazione. Esperimenti preliminari hanno permesso di stabilire le condizioni ottimali per l'espressione della proteina eterologa: 2 ore a 37°C con 1mM di IPTG. In queste condizioni entrambe le cellule esprimevano le Hys-PIN solo nella frazione insolubile (75% per le pLysS, 84% per le BL21*). L'induzione a 28°C ed overnight non aumentava la solubilità proteica. Dal momento che nelle pLysS l'espressione delle proteine ricombinanti era circa 3 volte in meno rispetto alle BL21* (Figura 8A, B), quest'ultime sono state scelte per l'espressione su larga scala. Le Hys-PIN sono state purificate con successo grazie all'utilizzo di colonne "Ni-NTA spin" in condizioni denaturanti (Figura 8C).

3.5. Espressione di GST-PINA e GST-PINB nelle cellule DH5α

Le puroindoline ricombinanti fuse alla GST, denominate GST-PINA e GST-PINB, sono state espresse come proteine di 38-kDa in cellule di *E. coli* DH5α. Le stesse condizioni utilizzate per le BL21* (1mM IPTG, 37°C, 2 ore) hanno portato ad un'ottima espressione proteica, comparabile a quella ottenuta nel ceppo BL21* (la concentrazione delle proteine nel campione indotto era circa 4 volte superiore rispetto al campione non indotto). In queste condizioni il 25% delle proteine di fusione erano presenti nella frazione solubile (Figura 9A) e il 75% era espresso nei corpi di inclusione. Sono state condotte delle prove per aumentare la solubilità proteica variando la temperatura ed il tempo di induzione. A 28°C e con 3 ore di induzione, il 55% della proteina ricombinante si è espressa nella frazione solubile (Figura 9B). Tempi di induzione minori o maggiori (2, 4, 5 e 16 ore) come pure minori temperature (20-25°C) non hanno contribuito all'incremento in percentuale delle proteine ricombinanti nella frazione solubile.

Le proteine solubili sono state sottoposte a purificazione mediante l'uso della Glutathione Sepharose 4B. Come mostrato in Figura 10, le proteine fuse alla GST si legavano efficientemente alla resina, ma, nella fase di eluizione, si riuscivano a purificare solo piccoli quantitativi di PIN e sempre associata ad altre proteine.

Per solubilizzare le proteine insolubili sono stati utilizzati 3 diversi tamponi (incubati overnight a 4°C): Urea 8M, GuHCl ed Urea/Triton. I risultati per tutti i tamponi sono mostrati in Figura 11. Il tampone Urea/Triton solubilizzava parzialmente tutte le proteine dei corpi di inclusione (incluse le GST-PIN), e incubazioni a tempi più lunghi (24 ore) non aiutavano ad aumentare la solubilizzazione (Figura 11A). Il tampone Urea 8M è stato capace invece di solubilizzare quasi tutte le proteine insolubili e solo un quantitativo esiguo (6%) delle GST-PIN; in tal modo, nella frazione insolubile

rimaneva il 94% delle GST-PIN insieme ad una proteina di approssimativamente 40-kDa (Figura 11B). Il tampone GuHCl solubilizzava completamente tutte le proteine insolubili, eccetto quella a 40-kDa, la stessa insolubile in Urea 8M, che è stata ritrovata solo parzialmente nel surnatante (Figura 11B). Sulla base di questi risultati sono stati combinati i tamponi Urea 8M e GuHCl: il campione è stato prima incubato overnight con Urea 8M; dopo centrifugazione il pellet (contenente quasi tutte le GST-PIN), è stato risospeso in tampone GuHCl ed incubato overnight. Come si può notare dalla Figura 11B, con questo protocollo è stato possibile recuperare per solubilizzazione l'85% delle GST-PIN dai corpi di inclusione e allo stesso tempo sbarazzarsi di tutte le altre proteine presenti nei corpi di inclusione.

3.6. Identità e purezza delle proteine ricombinanti purificate

Le Hys-PIN e le GST-PIN sono state analizzate mediante Western Immunoblotting. Il saggio, condotto utilizzando anticorpi rivolti contro il tag come pure quelli rivolti contro le puroindoline, ha permesso di valutare l'identità delle proteine ricombinanti. Tutti gli anticorpi (α -Hys, α -GST, α -PINA e α -PINB) sono stati in grado di riconoscere specificamente le proteine ricombinanti His-PINA, His-PINB, GST-PINA o GST-PINB (Figura 12A, B, C). Inoltre gli anticorpi rivolti contro le PIN hanno identificato le puroindoline native e ricombinanti allo stesso modo (Figura 12C).

3.7. Refolding delle puroindoline ricombinanti e taglio del tag

La procedura di refolding sia delle Hys-PIN che delle GST-PIN è stata eseguita dializzando le proteine solubilizzate contro tamponi contenenti concentrazioni decrescenti di agente denaturante e concentrazioni crescenti di glicerolo in PBS: 4 M GuHCl, 4 mM DTT; 2 M GuHCl, 3 mM DTT, 5% Glicerolo; 1 M GuHCl, 1 mM DTT, 10% Glicerolo; 20% Glicerolo. Ogni dialisi è stata condotta per 24 ore a 4°C. Mentre le GST-PIN hanno mostrato una buona percentuale di proteine refoldate (85%, Figura 13A), le Hys-PIN sono risultate meno inclini a refoldare bene, dando solo un 33% di proteine correttamente refoldate (Figura 14).

Le Hys-PIN e le GST-PIN con un corretto refolding sono state successivamente trattate per il taglio del tag. Il taglio della coda 6xHys da parte dell'enterochinasi non ha dato buoni risultati anche quando l'enzima è stato utilizzato in forte eccesso (4 unità) (Figura 14). Il taglio della GST con la trombina, invece, è stato condotto con successo, ottenendo quantità considerevoli di PIN libere dalla GST (circa 1.5 mg tag-free PIN da 1 l di coltura batterica indotta), come si può notare dall'SDS-PAGE (Figura 13A) e dal Western Immunoblotting (Figura 13B, C).

Dato che le Hys-PIN hanno dato uno scarso risultato nel refolding e che il taglio del tag è stato impossibile da effettuare nelle condizioni testate, gli studi sull'attività antimicrobica delle puroindoline ricombinanti sono stati condotti utilizzando solo le rPIN ottenute dal sistema di espressione pGEX/DH5 α .

3.8. Le rPIN inducono in ratto la produzione di anticorpi in grado di riconoscere le puroindoline native

Gli anticorpi prodotti in ratto contro le puroindoline ricombinanti sono stati testati mediante citofluorimetria utilizzando come antigene sia le puroindoline native che quelle ricombinanti. Come si può notare dai risultati, gli anticorpi Rat α PIN hanno riconosciuto sia le puroindoline native che quelle ricombinanti, mostrando la stessa intensità di fluorescenza (stessa mediana, Figura 15A). Esperimenti analoghi sono stati condotti utilizzando gli anticorpi rivolti contro le puroindoline native (Rat α PINA e Rat α PINB). Anche in questo caso non si sono osservate differenze quando le puroindoline native o ricombinanti sono state utilizzate come antigene (Figura 15B). I risultati sono stati supportati dal Western Immunoblotting.

3.9. Attività antibatterica delle rPIN

Le rPIN sono state esaminate per la loro capacità di inibire la crescita batterica (minima concentrazione inibente - MIC) e per la loro attività battericida (minima concentrazione battericida - MBC). I risultati ottenuti sono stati del tutto comparabili a quelli delle PIN native. rPINA ed rPINB, infatti, si comportano come le corrispettive forme native mostrando la stessa MIC (30 μ g/ml) sia su *E. coli* che su *S. aureus* (Tabella 6). Utilizzando lo stesso quantitativo di proteine su *S. epidermidis*, invece, è stata osservata un'inibizione incompleta (91%) della crescita batterica. Anche quando impiegate in *killing assays*, le rPIN hanno richiesto la stessa concentrazione delle native (10x della MIC) per uccidere il 100% dei batteri. Allo scopo di investigare il meccanismo d'azione delle puroindoline, le rPIN sono state testate su *E. coli* e *S. epidermidis* utilizzando il kit BacLight. Immediatamente dopo il contatto (tempo zero) fra *E. coli* e le proteine (1.25 μ g/10⁶ batteri per entrambe le rPIN), sono stati osservati solo debris cellulari (Figura 16B). rPINB ha funzionato anche a concentrazioni minori, dando il 70% di cellule morte quando utilizzato 10 volte diluito (0.125 μ g/10⁶ batteri) (Figura 16C), mentre rPINA ha avuto un'attività irrilevante a questa concentrazione. Risultati analoghi sono stati ottenuti testando le rPIN su *S. aureus*. Concentrazioni maggiori di rPIN sono state necessarie, invece, per indurre la morte di *S. epidermidis*: con 5 μ g di PINB è stato possibile ottenere solo il 56% di cellule morte (Figura 16E).

3.10. Espressione di GST-PINA e GST-PINB nel ceppo ORIGAMI™ B e purificazione di ORIA e ORIB

Data la difficoltà nella procedura di refolding delle puroindoline ricombinanti ottenute a partire dal sistema precedentemente descritto, il vettore pGEX:PIN è stato utilizzato per trasformare il ceppo ORIGAMI™ B, adatto all'espressione di proteine ricche in cisteina in quanto favorisce la corretta formazione dei ponti disolfuro nel citoplasma. Entrambe le PIN sono state espresse come proteine di 38-kDa, denominate GST-ORIA e GST-ORIB. Le colture sono state indotte con 1 mM di IPTG a 28°C per 3 ore. In queste condizioni è stato possibile ottenere il 68% delle proteine di fusione nella frazione solubile (Figura 17). GST-ORIA e GST-ORIB sono state purificate mediante

cromatografia d'affinità su resina Glutathione Sepharose 4B. La resa di purificazione per entrambe le rPIN è stata pari a 2.6 mg per litro di coltura batterica indotta.

3.11. Taglio della GST e caratterizzazione di ORIA ed ORIB

Le proteine fuse alla GST (2.6 mg) sono state tagliate attraverso due successive incubazioni overnight con 19 U e 13 U di trombina, rispettivamente. La trombina e la GST libera sono state successivamente rimosse per cromatografia su resina HiTrap Benzimidine e Glutathione Sepharose 4B. La resa delle puroindoline ricombinanti purificate (ORIA ed ORIB) è stata di 1.8 e 0.65 mg per litro di coltura batterica indotta, rispettivamente.

3.12. Proprietà antimicrobiche ed emolitiche di ORIA ed ORIB

ORIA ed ORIB sono state testate per la loro capacità di inibire la crescita di *S. epidermidis* e di lisare eritrociti di ratto. I saggi di inibizione della crescita batterica hanno mostrato che a 30 µg/ml, ORIA ed ORIB, testati individualmente, inibiscono la crescita di *S. epidermidis* del 90%. Studi sull'attività sinergica di ORIA e ORIB, inoltre, hanno mostrato che le due rPIN hanno lo stesso meccanismo d'azione delle proteine native, con un fattore di sinergia compreso tra 1 e 2.5.

Il saggio di conta in piastra ha dimostrato che ORIA (a 125 µg/ml) ed ORIB (a 40 µg/ml) riducono il numero di batteri di 4 log in 15 minuti. Risultati simili sono stati ottenuti anche con PINA (a 120 µg/ml) ed PINB (a 40 µg/ml) native. Quando l'incubazione è stata protratta per 24 ore, non è stata osservata alcuna crescita batterica.

Inoltre, fino a 150 µg/ml di ORIA e 50 µg/ml di ORIB, le puroindoline ricombinanti non hanno mostrato attività emolitica.

Risultati analoghi sono stati ottenuti testando le rPIN su *S. aureus*.

3.13. Analisi dell'attività antimicrobica mediante microscopia a fluorescenza

ORIA e ORIB a concentrazioni comprese tra 1 µg/ml e 40 µg/ml sono state incubate per 1 ora con *S. epidermidis* (2×10^7 cellule/ml). A 40 µg/ml – la più alta concentrazione testata – ORIA ed ORIB hanno ucciso rispettivamente il 40% ed il 60% dei batteri (Figura 18).

3.14. Analisi dell'attività antimicrobica mediante citofluorimetria

S. epidermidis (2×10^7 cellule/ml) è stato incubato per 2 ore con concentrazioni di ORIA e ORIB comprese tra 1 µg/ml e 25 µg/ml. A 20 µg/ml – la concentrazione più alta compatibile con il saggio – ORIA ed ORIB hanno ucciso rispettivamente il 20% ed il 60% dei batteri (Figura 19). A concentrazioni maggiori di 20 µg/ml, ORIA e ORIB determinavano la morte del 100% dei batteri, ma la loro morfologia non era distinta da quella dei debris.

3.15. Induzione di accumulo di nitriti da parte di ORIA ed ORIB in macrofagi in coltura

ORIA ed ORIB non inducono sintesi di ossido nitrico (NO) nella linea cellulare murina di monociti-macrofagi J774, quando testate a 10-150 µg/ml (ORIA) o 2-50 µg/ml (ORIB) per 24-72 ore (Tabella 7). Rispetto alla sintesi di NO, non è stata individuata nessuna differenza apprezzabile tra le cellule trattate e non trattate con le proteine ricombinanti. Il test di vitalità (test MTT) ha stabilito che – alle più alte concentrazioni di rPIN utilizzate nel saggio (150 µg/ml per ORIA e 50 µg/ml per ORIB) – i macrofagi rimangono vitali fino a 72 ore.

3.16. Infezione *in vitro* di cellule J774 con *S. epidermidis* e analisi della vitalità dei batteri intracellulari dopo il trattamento con ORIA ed ORIB

ORIA ed ORIB sono state capaci di penetrare all'interno delle cellule J774 ed uccidere gli stafilococchi intracellulari. Gli esperimenti hanno dimostrato che concentrazioni di ORIA e ORIB 10 volte maggiori di quelle utilizzate contro i batteri extracellulari sono in grado di ridurre la crescita batterica di 3 log in 3 ore. Quando l'incubazione è stata protratta fino a 24 ore, non è stata osservato nessun aumento nell'inibizione della crescita batterica (Figura 20).

3.17. Infezione *in vivo* di topi con *S.aureus* e analisi dell'infezione dopo il trattamento con le rPIN

Due gruppi di topi (3 topi/gruppo) sono stati infettati tramite iniezione intravena con 10^6 o 10^7 CFU/topo. L'infezione è stata mantenuta in entrambi i gruppi di animali per almeno 2 settimane. Nei Successivi esperimenti l'infezione è stata effettuata con una singola iniezione di 10^6 CFU/topo; questa dose è stata preferita, perché imitava le infezioni causate da stafilococco negli animali (che generalmente cominciano con un piccolo inoculo) e riduceva il rischio di sepsi. I batteri sono stati isolati da vari organi (milza, fegato, reni, cuore e polmoni) un giorno dopo l'infezione e per le successive due settimane. I reni sono stati gli organi che mostravano una maggiore carica batterica (Figura 21A). L'efficacia delle rPIN è stata quindi stabilita misurando il livello di infezione (numero di CFU) di tali organi.

3.17.1. Il pre-trattamento dei topi con le rPIN inibisce la crescita batterica

Cinque gruppi di topi (3 topi/gruppo) sono stati trattati con crescenti dosi di ORIA o ORIB (0.019, 0.078, 0.312, 1.25 o 5 mg/topo). Il giorno successivo i topi sono stati infettati con *S. aureus* (10^6 CFU/mouse). Un ulteriore gruppo di topi è stato utilizzato come controllo non trattato. ORIA e ORIB hanno mostrato proprietà profilattiche e la capacità di controllare l'infezione, ma in misura differente. Infatti, sebbene entrambe le rPIN determinavano sterilità alla concentrazione di 5 mg/topo, la riduzione del numero di CFU di 3 unità logaritmiche (3 log) nell'organo bersaglio (i reni), ha richiesto 1.25 mg/topo di ORIA o 0.312 mg/topo di ORIB (Figura 21B). Somministrate insieme, ORIA e ORIB hanno mostrato un'azione sinergica: 0.014 mg/topo di ORIA e

0.005 mg/topo di ORIB sono sufficienti per rendere l'animale completamente sterile (Figura 21C).

3.17.2. Il pre-trattamento dei topi con le rPIN inibisce l'infiammazione

Per capire se le rPIN prevengono l'infiammazione cui segue l'infezione dell'ospite con *S. aureus*, 2 gruppi di topi sono stati trattati con ORIA o ORIB, rispettivamente. Ogni rPIN è stata utilizzata alla dose capace di rendere l'animale sterile (ORIA o ORIB 5 mg/topo: Figura 21B). Il giorno seguente, i topi trattati con ORIA o ORIB sono stati infettati con *S. aureus* (10^6 CFU/topo). L'esperimento ha incluso anche topi non trattati con le rPIN e non infettati con *S. aureus* (topi naïve); trattati, ma non infettati (topo trattati); infettati, ma non trattati (topi infettati). Ogni gruppo era costituito da 3 animali. Ai giorni 1, 3 e 5 dopo l'infezione, i livelli di espressione dell'mRNA di IL-6 e TNF- α nei reni sono stati determinati per RT-PCR. L'infezione con *S. aureus* determinava un aumento significativo dei livelli di mRNA di IL-6 ($P < 0.0001$) e TNF- α ($P < 0.0001$) dei topi infetti (Figura 22). Inoltre, i topi infettati trattati con ORIA o ORIB mostravano, dopo un giorno, una riduzione dell'espressione dell'mRNA di IL-6 e TNF- α , rispetto ai topi naïve (Figura 22).

Agli stessi animali sono stati determinati anche i seguenti parametri di infiammazione: il livello di espressione dell'antigene CD25 (tramite citofluorimetria a flusso), le concentrazioni della proteina C reattiva (PRC) e del fibrinogeno nel siero (tramite ELISA). ORIA e ORIB, usate individualmente, riducevano significativamente ($P < 0.0001$) l'espressione dell'antigene CD25 (Figura 23) e la concentrazione della proteina C reattiva (Tabella 8) e del fibrinogeno (Tabella 9) dei topi trattati e infettati, mentre non influenzavano gli stessi parametri quando testate su topi non infetti, ma solo trattati con le rPIN.

3.17.3. Attività terapeutica delle rPIN

Cinque gruppi di topi (3 topi/gruppo) sono stati infettati con *S. aureus* (10^6 CFU/topo) e successivamente trattati con quattro iniezioni giornaliere di ORIA o ORIB (0.019, 0.078, 0.312, 1.25 o 5 mg/topo). La prima dose è stata somministrata immediatamente dopo l'infezione. Un ulteriore gruppo di animali è stato utilizzato come controllo non trattato. Entrambe le rPIN non hanno mostrato attività terapeutica contro le infezioni da *Staphylococcus*, in quanto nessuna delle dosi testate ha consentito una riduzione dell'infezione batterica nei topi infetti (Figura 21D).

4. DISCUSSIONE

Il presente lavoro dimostra, per la prima volta, la co-localizzazione di PINA e PINB nella cariosside matura di frumento tenero utilizzando anticorpi policlonali specifici per tali proteine (Figure 4 e 5). Questi risultati non sono in linea con un precedente lavoro secondo il quale le due puroindoline vanno a localizzarsi in siti diversi (Dubreil et al., 1998); queste proteine sono invece entrambe abbondanti nell'endosperma amilifero e nello strato aleuronico, e sono altamente concentrante soprattutto in quest'ultimo (Figura 4). Diversi autori hanno ipotizzato un ruolo delle puroindoline nella difesa della cariosside contro i patogeni (Dubreil et al., 1998; Krishnamurthy et al., 2001), e la loro distribuzione nel seme sembra confermare tale ipotesi. E' stato dimostrato, infatti, che in tutte le cultivar analizzate PINA e PINB sono altamente concentrate nello strato più esterno della cariosside, l'aleurone, che è il primo sito di attacco dei patogeni (García-Olmedo et al., 1998). Inoltre, le puroindoline sono abbondanti anche nell'endosperma, dove molti patogeni possono arrivare entrando nel seme attraverso lesioni nell'aleurone. D'altro canto sono state recentemente scoperte nuove proteine antifungine nell'endosperma del seme di mais (Serna et al., 2001).

L'attività antimicrobica di PINA e PINB è stata dimostrata *in vitro* contro 6 differenti ceppi batterici: 2 patogeni animali e 4 patogeni vegetali. Il valore della MIC delle puroindoline è stata diversa a seconda del ceppo testato, ma è interessante come PINA e PINB abbiano bisogno della stessa concentrazione per essere completamente inibitorie (Tabella 3). La loro tossicità contro *E. coli* è stata osservata anche a concentrazioni inferiori alla MIC. A 1/3 del valore della MIC PINB è molto più attiva di PINA nell'inibire la crescita batterica (82% e 2%, rispettivamente). A 2/3 del valore della MIC le due proteine mostrano invece la stessa capacità inibitoria (89 e 84%, rispettivamente (Tabelle 4 e 5).

Inoltre, è stato visto che PINA e PINB non solo hanno la stessa distribuzione spaziale nella cariosside di frumento tenero, ma sono sempre co-localizzate (Figura 4). Questo risultato inaspettato ha portato a pensare ad una possibile cooperazione delle due proteine nella difesa della pianta. A riguardo Dubreil et al. (1998) hanno già dimostrato con successo la capacità delle PIN di cooperare con una potente proteina antifungina, l' α -PTH, aumentandone la tossicità. Tuttavia, una possibile cooperazione fra PINA e PINB non è mai stata analizzata. I risultati ottenuti in questo lavoro hanno suggerito che le due puroindoline cooperano in qualche modo *in vitro* contro i patogeni, sebbene abbiano mostrato un comportamento differente quando testate per la possibile capacità di aumentare la tossicità dell'altra proteina. In particolare PINB, quando utilizzata come proteina subinibitoria, aumenta la tossicità di PINA adoperata a basse concentrazioni (1/3 del valore della MIC). Invece è risultata influente quando aggiunta già ad alte concentrazioni di PINA (2/3 del valore della MIC), ma capace di abbassare lievemente la sua MIC (Tabelle 4, 5). Al contrario, PINA aggiunta come proteina subinibitoria ad 1/3 del valore della MIC di PINB non è risultata efficiente, mentre è utile per ottenere una completa inibizione della crescita quando aggiunta a 2/3 del valore della MIC di PINB. E' stato osservato, inoltre, che PINA è in grado di abbassare il valore della MIC di PINB per tutti i batteri testati. Riassumendo, sembra che mentre PINA necessita più alte concentrazioni per determinare la morte dei batteri, PINB richieda una concentrazione minore. Probabilmente la presenza di PINB in piccole quantità induce per prima la morte dei batteri. Inoltre, sembra che una volta raggiunto il quantitativo minimo di PINA

necessario a inibire la crescita batterica, l'aggiunta di PINB non ne influenzi sostanzialmente la tossicità. D'altro canto, la capacità inibitoria di PINB aumenta con la presenza di PINA solo quando la prima è già ad alte concentrazioni. Ulteriori studi sarebbero necessari per chiarire il perché di queste differenze. Dai risultati ottenuti si può finora affermare che le due puroindoline possono avere meccanismo d'azione diverso ma in alcune condizioni sinergico. A tal proposito è stato riportato in letteratura che PINA è in grado di causare pori nella membrana lipidica (Charnet et al., 2003); PINB potrebbe invece avere un meccanismo d'azione diverso, a noi sconosciuto.

Questi risultati suggeriscono che le puroindoline potrebbero essere utilizzate in diverse applicazioni, e anche nel campo alimentare. Data la loro origine naturale e la loro funzione, potrebbero essere utilizzate come preservanti in campo alimentare (come fatto per la batteriocina nisina, Delves-Broughton et al., 1996). Al riguardo, è interessante notare che le PIN sono ancora identificabili nelle preparazioni alimentari dopo cottura e conservazione; tuttavia, ulteriori esperimenti sarebbero necessari per verificare se la loro attività sia conservata dopo tali processi.

Dato il crescente problema di resistenza agli antibiotici convenzionali (Hancock e Lehrer, 1998; Hancock, 2001) e la crescente esigenza di trovare nuove molecole efficaci contro i batteri (Moy et al., 2006), le puroindoline potrebbero essere considerate anche come possibili agenti terapeutici. Per valutare questo utilizzo, sono stati condotti test di attività antimicrobica su diversi patogeni (anche antibiotico resistenti) e test di citotossicità. Tali esperimenti hanno richiesto quantità maggiori di entrambe le proteine rispetto a quanto possibile produrre con la tecnica dell'immunoassorbente. Per questo motivo è stato messo a punto un sistema di espressione ricombinante.

I batteri sono largamente utilizzati per esprimere proteine eterologhe da utilizzare nella ricerca e come farmaci. *E. coli* è un sistema di espressione conveniente per la produzione e purificazione di proteine ricombinanti, grazie alla facilità d'utilizzo, il tempo di generazione elevato, il basso costo e la sua facile disponibilità. Tuttavia l'utilizzo di *E. coli* presenta anche alcuni svantaggi come: bassa probabilità di successo nell'espressione di proteine eucariotiche, assenza di molte modificazioni post-traduzionali, localizzazione del prodotto di espressione nei corpi di inclusione (Baneyx, 1999). Sebbene esistano in letteratura molti esempi di proteine ricombinanti espresse in sistemi procariotici, proteine differenti possono necessitare di approcci diversi, rispondendo poco alla generalizzazione. Talvolta, inoltre, per ottenere risultati ottimali, può essere necessario utilizzare più costrutti per ogni proteina di interesse. Una valida strategia per rendere il lavoro meno complesso è l'utilizzo di tag alle estremità N- o C-terminale della proteina ricombinante che, in questo caso, sarà denominata proteina di fusione (Nilsson et al., 1997). Essi possono influenzare il comportamento delle proteine di interesse durante i diversi step di espressione, purificazione ed utilizzo. Sono stati descritti in letteratura diversi tag, ognuno con diverse caratteristiche che influenzano la stabilità, la solubilità ed il livello di espressione delle proteine nei batteri (Stevens et al., 2001).

Proprio per questo motivo, nel presente lavoro sono stati analizzati gli effetti di diversi vettori sull'espressione, la purificazione e le proprietà di solubilità delle puroindoline ricombinanti. In particolare, i geni codificanti per le PIN sono stati clonati in due diversi vettori: uno esprime la proteina legata ad un tag 6xHys ed uno esprime la proteina di interesse fusa alla Glutathione-S-transferasi (GST), che è capace di incrementare la solubilità della proteina eterologa in *E. coli*. Entrambi i vettori sono stati utilizzati per trasformare cellule di *E. coli* BL21*, DH5α e pLysS. I risultati ottenuti

con le Hys-PIN non sono stati per niente incoraggianti: sebbene il livello di espressione fosse soddisfacente, non è stato possibile ottenere proteine purificate e biologicamente attive (Figure 8 e 14). Per quanto riguarda le GST-PIN, invece, solo quelle presenti nei corpi di inclusione sono state purificate, refoldate ed eliminate del tag efficientemente, mentre non è stato possibile purificare in modo ottimale le proteine della frazione solubile (Figure 9, 10, 11 e 13). Le rPIN e le PIN native hanno mostrato lo stesso livello di tossicità nei confronti di *E. coli* e *S. aureus* (Tabella 6) e gli anticorpi ottenuti contro le rPIN hanno riconosciuto con la stessa efficacia le PIN native e quelle ricombinanti (Figura 15). Tali risultati hanno suggerito che le rPIN sono foldate come le corrispettive forme native e che hanno la stessa attività biologica contro i patogeni. Il loro meccanismo d'azione non è ancora chiaro, ma sicuramente agiscono danneggiando la membrana dei patogeni. Questo, infatti, è stato dimostrato dalla capacità dello ioduro di propidio di penetrare nella cellula batterica in presenza di PINB (Figura 16).

I risultati conseguiti, hanno reso sempre più concreto e promettente l'utilizzo delle puroindoline quali agenti terapeutici. Tuttavia il protocollo di purificazione rappresentava un limite, data la scarsa resa proteica ottenuta rispetto al lavoro e al tempo necessari. Per superare questo limite, l'espressione delle rPIN è stata ottimizzata trasformando il ceppo di *E. coli* ORIGAMI™ B con il vettore di espressione delle GST-PIN. Il batterio ospite è ingegnerizzato appositamente per favorire la corretta formazione dei ponti disolfuro delle proteine ricombinanti nel citoplasma. Grazie all'utilizzo di questo sistema, è stato possibile purificare efficacemente le puroindoline ricombinanti (ORIA ed ORIB) dalla frazione solubile in forma funzionale (Figura 17). Le rPIN sono state testate individualmente contro *S. epidermidis*, causando un'inibizione del 90% della crescita del batterio alla concentrazione di 30 µg/ml. A più alte concentrazioni – ORIA a 125 µg/ml e ORIB a 40 µg/ml – le stesse proteine hanno determinato la morte del 100% dei batteri (Figure 18 e 19). Quando testate in combinazione le rPIN hanno mostrato un'attività sinergica analoga a quella delle rispettive forme native. Inoltre test *in vitro* hanno dimostrato che ORIA ed ORIB non causano infiammazione o emolisi (Tabella 7).

Questi risultati sono molto incoraggianti, se si considera il possibile uso delle puroindoline nel trattamento di infezioni da *S. aureus*, *S. epidermidis* e, in generale, da ceppi batterici multiresistenti responsabili delle infezioni cutanee. Inoltre è ben documentato che *S. epidermidis* e *S. aureus* sono capaci di internalizzarsi e sopravvivere in un ampio numero di cellule animali (Boelens et al., 2000). È stato visto che la capacità di *S. epidermidis* di entrare all'interno della cellula permette la colonizzazione a lungo termine dell'ospite ed il mantenimento di uno stato infettivo cronico (Foster, 2005). Un'applicazione clinica di ORIA ed ORIB è stata dimostrata dalla loro capacità di uccidere stafilococchi intracellulari a concentrazioni superiori a quelle determinate per i batteri extracellulari (1250 µg/ml per ORIA e 400 µg/ml per ORIB) (Figura 20).

Numerosi studi (Hong et al., 2003; Mattei et al., 1998) indicano che il bersaglio delle proteine ad azione antimicrobica è la membrana batterica. I risultati degli esperimenti di citofluorimetria con i batteri rafforzano tale ipotesi, così come gli esperimenti di microscopia a fluorescenza. Infatti, la carbossifluoresceina – il fluorocromo utilizzato per marcare lo *S. epidermidis* – è ritenuta all'interno della cellula solo se la membrana cellulare è intatta (Charnet et al., 2003; Jing et al., 2003). Il fatto che lo *S. epidermidis* marcato con CFDA perda fluorescenza dopo incubazione con ORIA o ORIB, indica che le due proteine distruggono l'integrità della membrana batterica (Figure 18 e 19).

Ulteriori indagini sulle proprietà farmacologiche delle puroindoline sono stati condotti effettuando test *in vivo*, utili per determinare la tossicità delle proteine ed il loro possibile utilizzo nelle procedure di profilassi o nel trattamento di infezioni da stafilococco. In particolare, l'attività antimicrobica e anti-infiammatoria delle puroindoline è stata testata su un modello animale rappresentato da topi infettati con *S. aureus*. La scelta è ricaduta su questo patogeno in considerazione della sua importanza clinica in relazione alla mastite (Nagahata H. et al., 2007) e del drammatico aumento delle infezioni da stafilococco, soprattutto dei ceppi meticillina-resistenti (King et al., 2006).

ORIA e ORIB, somministrate ai topi un giorno prima dell'infezione sperimentalmente da *S. aureus*, inibiscono la crescita batterica e la produzione di IL-6 e TNF- α , due marker della risposta infiammatoria (Figura 22). È importante, inoltre, sottolineare come queste proteine siano attive quando usate individualmente (Figura 21B) o in combinazione (Figura 21C). Quando usate in associazione, le rPIN mostrano un'azione sinergica e combattono l'infezione a dosi significativamente più basse di quelle necessarie quando le due proteine sono usate individualmente (Figura 21C).

Nella prima fase dell'infezione, i neutrofili e i monociti, a seguito del contatto con i prodotti batterici, inducono una up-regolazione delle citochine proinfiammatorie (quali IL-6 e TNF- α) avviando la risposta infiammatoria. Tuttavia, quando prolungata o eccessiva, la risposta infiammatoria cessa di essere protettiva e può causare danni ai tessuti o addirittura la morte (Scaglione e Rossoni, 1998). La capacità delle puroindoline di controllare i livelli di IL-6 e TNF- α (Figura 22) è perciò molto importante, soprattutto in considerazione del fatto che un elevato livello di IL-6 è indice di gravità della malattia e di mortalità, e che TNF- α è la citochina direttamente coinvolta nel danneggiamento di tessuti e organi (Remick et al., 2002).

L'analisi di campioni di sangue prelevati da topi infetti da *S. aureus* e trattati con ORIA o ORIB, ha mostrato una riduzione significativa della concentrazione di proteina C reattiva e di fibrinogeno nel plasma (Tabella 8 e Tabella 9) e una riduzione del livello di espressione dell'antigene CD25 (Figura 23). Questi risultati indicano, inoltre, la capacità delle puroindoline ricombinanti di controllare la risposta infiammatoria causata da infezioni batteriche.

Studi condotti su cavie da laboratorio (generalmente topi) per determinare l'efficacia di sostanze antimicrobiche *in vivo*, spesso non danno risultati soddisfacenti o chiari, a causa dell'uso di un'elevata carica batterica. Va considerato, comunque, che nella maggioranza dei casi, le infezioni naturali iniziano a partire da un piccolo inoculo. Inoltre, un'alta carica batterica può causare un rapido rilascio di tossine; di conseguenza, spesso gli animali muoiono di sepsi, piuttosto che a causa dell'infezione batterica. In questo lavoro, abbiamo cercato di migliorare gli attuali modelli animali, riducendo l'inoculo batterico iniziale e misurando l'efficacia delle puroindoline, con la loro capacità di rendere sterile l'organo bersaglio (piuttosto che la capacità delle proteine di salvare i topi da una dose di batteri letali). Questo approccio, inoltre, ci ha permesso di seguire l'andamento dell'infezione negli animali trattati nell'arco di diversi giorni.

Infine, ORIA e ORIB hanno mostrato una serie di caratteristiche e proprietà che le rendono promettenti candidati come proteine antibatteriche: mostrano sinergia con altre proteine antimicrobiche (Petrykat et al., 2003; Capparelli et al., 2005; Llanos et al., 2006; Capparelli et al., 2007); sono attive contro ceppi batterici antibiotico-resistenti e, a differenza di molti antibiotici, riducono lo shock settico (Petrykat et al., 2003).

In conclusione possiamo affermare che le rPIN sono agenti antibatterici che potrebbero essere efficacemente utilizzate nella prevenzione delle infezioni mastitiche degli animali da allevamento. Il loro utilizzo diventa ancora più prezioso se consideriamo il problema dell'antibiotico resistenza che, negli ultimi anni, sta diventando particolarmente serio. Fenomeni di resistenza nei confronti di proteine e peptidi antimicrobici sono molto improbabili, proprio grazie alla loro rapida azione e selettività verso le membrane. E' difficile immaginare un organismo che riorganizzi la composizione della propria membrana cellulare per resistere ad una molecola e ciò è dimostrato dal fatto che sono stati trovati ceppi di batteri dei generi *Morganella* e *Serratia* resistenti, che presentano una minore composizione di acidi grassi nella membrana plasmatica, ma che per lo stesso motivo presentano una fitness molto ridotta (Zasloff, 2002). Inoltre, data la diffusa presenza di ceppi di stafilococco antibiotico resistenti (Campoccia et al., 2005; Dreno et al., 2001; Nishijima et al., 2000), indagare su come ORIA ed ORIB possano rimpiazzare i classici antibiotici nel controllo di *S. epidermidis* è un approccio sensato. Tuttavia, ulteriori studi potrebbero essere condotti per determinare l'attività sinergica delle puroindoline con altre proteine ad attività antimicrobica di origine animale (come royaljelline, lattoferrina e lisozima), al fine di creare un cocktail di proteine in grado di superare l'attuale limite di utilizzo delle puroindoline unicamente come pretrattamento, ma tale da poter essere utilizzato anche nel trattamento delle infezioni da stafilococco e di altri patogeni.

5. BIBLIOGRAFIA

- Abbas, A. K., Lichtman, A.H. and Prober, J.S. (2000). Immunologia cellulare e molecolare. 1: 4-15.
- Andersson, R. and Leon, L. (1999). "Convegno scientifico in agricoltura biologica" 23-25 Febbraio 99. Berlino. Pag. 380-381. Editore DR Koster.
- Armstrong, N., De Lencastre, A. and Gouaux, E. (1999). A new protein folding screen: application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Sci.* 8(7): 1475-1483.
- Ashitani, J. J., Mukae, H., Hiratsuka, T., Nakazato, M., Kumamoto, K. and Matsukara, S. (2002). Elevated levels (alpha)-defensin in plasma and BAL fluid of patients with active pulmonary tuberculosis. *Chest.* 121: 519-526.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 411-421.
- Barkema, H. W., Schukken, Y. H., Lam, T. J. G. M., Beiboer, M. L., Benedictus, G. and Brand, A. (1998). Management practices associated with low, mid, and high bulk milk somatic cell count. *J. Dairy Sci.* 81: 1917-1927.
- Bechinger, B. (1997). Structure and functions of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J. Membrane Biol.* 156: 197-211.
- Blochet, J. E., Chevalier, C., Forest, E., Pebay-Peyroula, E., Gautier, M. F., Joudrier, P., Pézolet, M. and Marion, D. (1993). Complete amino acid sequence of puroindoline, a new basic and cysteine-rich protein with a unique tryptophan-rich domain, isolated from wheat endosperm by Triton X-114 phase partitioning. *FEBS Lett.* 329: 336-340.
- Boelens, J. J., Dankert, J., Murk, J. L., Weening, J. J., Van der Poll, T., Dingemans, K. P., Koole, L., Laman, J. D. and Zaat, S. A. J. (2000). Biomaterial-associated persistence of *Staphylococcus epidermidis* in pericatheter macrophages. *J. Infect. Dis.* 181: 1337-1349.
- Boman, H. G. (2003). Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *Journal of Internal Medicine.* 254: 197-215.
- Boman, H. G., (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 61-92.
- Boulanger, V., Zhao, X., Lauzon, K. and Lacasse, P. (2007). Effects of nitric oxide on bovine polymorphonuclear functions. *Can. J. Vet. Res.* 71(1): 52-58.
- Bramley, A. J., Cullor, J. S., Erskine, R. J., Fox, L. K., Harmon, R. J., Hogan, J. S., Nikerson, S. C., Oliver, S. P., Smith, K. L. and Sordillo, L. M. (1996). Methods of controlling mastitis in dairy cows. *Current Concepts of Bovine Mastitis*. 4th ed. (National Mastitis Council, Inc. ed.), Wisconsin. 39-46.
- Branlard, G., Amiour, N., Igrejas, G., Gaborit, T., Herbette, S., Dardevet, M. and Marion D. (2003). Diversity of puroindolines as revealed by two-dimensional electrophoresis. *Proteomics.* 3: 168-174.
- Broekaert, W. F., Cammue, B. P. A., De Bolle, M. F. C., Thevissen, K., De Samblanx, G. W. and Osborn, R. W. (1997). Antimicrobial peptides from plants. *Crit Rev Plant Sci.* 16: 297-323.
- Bruckmaier, R. M. (2005). Gene expression of factors related to the immune reaction in response to intramammary *Escherichia coli* lipopolysaccharide challenge. *J. Dairy Res.* 72:120-124.

- Busani, L., Graziani, C., Franco, A., Di Egidio, A., Grifoni, G., Formato, G., Sala, M., Binkin, N. and Battisti, A. (2003). Gli antibiotici nell'allevamento bovino: risultati di un'indagine tra i veterinari del settore. *BEN-Notiziario ISS*. 16: 7-8.
- Cai, G., Faleri, C., Del Casino, C., Hueros, G., Thompson, R. D. and Cresti, M. (2002). Subcellular localisation of BETL-1, -2 and -4 in *Zea mays* L. endosperm. *Sex Plant Reprod.* 15: 85-98.
- Campoccia, D., Montanaro, L., Baldassarri, L., An, Y. H. and Arciola, C. R. (2005). Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from implant orthopedic infections. *Int. J. Artif. Organs*. 28: 1186-1191.
- Capparelli, R., Borriello, G., Giroux, M. J. and Amoroso, M. (2003). Puroindoline A-gene expression is involved in association of puroindoline to starch. *Theor. Appl. Genet.* 107: 1463-1468.
- Capparelli, R., Amoroso, M. G., Palumbo, D., Iannaccone, M., Faleri, C. and Cresti, M. (2005). Two plant puroindolines colocalize in wheat seed and in vitro synergistically fight against pathogens. *Plant Mol Biol.* 58: 857-67.
- Capparelli, R., Ventimiglia, I., Palumbo, D., Nicodemo, D., Salvatore, P., Amoroso, M. G., and Iannaccone, M. (2007). Expression of recombinant puroindolines for the treatment of staphylococcal skin infections (acne vulgaris). *J Biotechnol.* 29: 279-84.
- Cardile, V., Proietti, L., Panico, A. and Lombardo, L. (2004). Nitric oxide production in fluoro-edenite treated mouse monocyte-macrophage cultures. *Oncol. Rep.* 12: 1209-1215.
- Charnet, P., Molle, G., Marion, D., Rousset, M. and Lullien-Pellerin, V. (2003). Puroindolines form ion channels in biological membranes. *Biophys J.* 84: 2416-2426.
- D'acquisto, F., De Cristofaro, F., Maiuri, M. C., Tajana, G. and Carnuccio, R. (2001). Protective role of nuclear factor kappaB against nitric oxide-induced apoptosis in J774 macrophages. *Cell Death Differ.* 8: 144-151.
- Daley, M. J., Coyle, P. A., Williams, T. J., Furda, G., Dougherty, R. and Hayes, P. W. (1991). *Staphylococcus aureus* mastitis: pathogenesis and treatment with bovine interleukin-1b and interleukin-2. *J. Dairy Sci.* 74 :4413-4424.
- Daley, M. J., Furda, G., Dougherty, R., Coyle, P. A., Williams, T. J. and Johnston, P. (1992). Potentiation of antibiotic therapy for bovine mastitis by recombinant bovine interleukin-2. *J. Dairy Sci.* 75: 3330-3338.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. and Hugenholtz, J. (1996). Application of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*. 69: 193-202.
- Direttiva 97/72/CE della Commissione del 15 dicembre 1997 relativa agli additivi nell'alimentazione degli animali. GU n. L 351 del 23 dicembre 1997. p. 0055-9.
- Dreno, B., Reynaud, A., Moyse, D., Habert, H. and Richet, H. (2001). Erythromycin-resistance of cutaneous bacterial flora in acne. *Eur. J. Dermatol.* 11: 549-553.
- Dubreil, L., Gaborit, T., Bouchet, B., Galliant, D. J., Broekaert, W. F., Quillien, L. and Marion, D. (1998). Spatial and temporal distribution of the two major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein (ns-LTPe1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Sci.* 138: 121-135.
- Egorov, T. A., Odintsova, T. I., Pukhalsky, V. A., Grishin, E. V. (2005). Diversity of wheat anti-microbial peptides. *Peptides*. 26: 2064-2073.
- Epand, R.M., and H.J. Vogel, (1999). Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta*; 1462: 11-28.

- Erskine, R. J., Bartlett, P. C., Tavernier, S. R., Fowler, L. H., Walker, R. D., Seguin, J. H. and Shuster, D. (1998). Recombinant bovine interleukin-2 and dry cow therapy: efficacy to cure and prevent intramammary infections, safety and effect on gestation. *J. Dairy Sci.* 81(1): 107-115.
- Ferrandon, D., Hethu C. and Reichhart, J. M. (2002). L'immunità innata. *Le Scienze.* 13: 4-9.
- Fitzpatrick, J. L. (2000). *Staphylococcus aureus* mastitis: past problems, future risks. *Cattle Practice.* 3: 273-277.
- Foster, T. J. (2005). Immune evasion by *Staphylococci*. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 948-958.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, M., Josefa, M. A. and Rodríguez-Palenzuela, P. (1998). Plant defence peptides. *Biopolymers.* 47: 479-491.
- Garcia-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Hernandez-Lucas, C., Ponz, F., Marana, C., Carmona, M. J., Lopez-Fando, J., Fernandez, J. A. and Carbonero, P. (1989). The thionins: a protein family that includes purothionins, viscotoxins and crambin. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.* 6: 31-60.
- García-Olmedo, F., Rodríguez-Palenzuela, P., Molina, A., Alamillo, J. M., Lopez-Solanilla, E., Berrocal-Lobo, M. and Poza-Carrion, C. (2001). Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.* 498: 219-222.
- Gautier, M. F., Aleman, M. E., Guirao, A., Marion, D. and Joudrier, P. (1994). *Triticum aestivum* puroindolines, two basic cysteine-rich seed proteins: cDNA sequence analysis and developmental gene expression. *Plant molecular Biology.* 25: 43-57.
- Giroux, M. J. and Morris, F. C. (1997). A glycine to serine change in puroindoline b is associated with wheat grain hardness and low levels of starch surface friabilin. *Theor. Appl. Genet.* 95: 857-864.
- Greenblatt, G. A., Bettege, A. D., and Morris, C. F. (1995). Relationship between endosperm texture and the occurrence friabilin and bound polar lipids on wheat starch. *Cereal Chem.* 72: 172-176.
- Greenwell, P. and Schofield, J. D. (1998). A starch granule protein associated with endosperm softness in wheat. *Cereal. Chem.* 63: 379-380.
- Guerneve, C. L., Seigneuret, M. and Marion, D. (1998). Interaction of the wheat endosperm lipid-binding protein puroindoline-a with phospholipids. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 360: 179-186.
- Hancock, R. E. W. and Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Tibtech.* 16: 82-88.
- Hancock, R. E. W. (2001). Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect. Dis.* 1: 156-64.
- Herigstad, B., Hamilton, M. and Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate methods for enumerating bacteria. *J. Microbiol. Methods.* 44: 121-129.
- Hyvonen, P., Suojala, L., Orro, T., Haaranen, J., Simola, O., Rontved, C. and Pyorala, S. (2006). Transgenic cows that produce recombinant human lactoferrin in milk are not protected from experimental *Escherichia coli* intramammary infection. *Infect. Immun.* 74(11): 6206-6212.
- Hong, R. W., Shchepetov, M., Weiser, J. N. and Axelsen, P. H. (2003). Transcriptional profile of the *Escherichia coli* response to the antimicrobial insect peptide cecropin A. *Antimicrob. Agents Ch.* 1: 1-6.
- Jing, W., Demcoe, A. R. and Vogel, H. J. (2003). Conformation of a bactericidal domain of puroindoline a: structure and mechanism of action of a 13-residue antimicrobial peptide. *J. Bacteriol.* 185: 4938-4947.

- King, M. D., Humphrey, B. J., Wang, Y. F., Kourbatova, E. V., Ray, S. M. and Blumberg, H. M. (2006). Emergence of community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA 300 clone as the predominant cause of skin and softtissue infections. *Ann. Intern. Med.* 144: 309-17.
- Komine, K., Komine, Y., Kuroishi, T., Kobayashi, J., Obara, Y. And Kumagai, K. (2005). Small molecule lactoferrin with an inflammatory effect but no apparent antibacterial activity in mastitic mammary gland secretion. *J. Vet. Med. Sci.* 67(7): 667-677.
- Komine, Y., Komine, K., Kay, K., Itagaki, M., Kuroishi, T., Aso, H., Obara, Y. And Kumagai, K. (2006). Effect of combination therapy with lactoferrin and antibiotics against staphylococcal mastitis on drying cows. *J. Vet. Med. Sci.* 68(3): 205-211.
- Krishnamurthy, K. and Giroux, J. (2001). Expression of wheat puroindoline genes in transgenic rice enhances grain softness. *Nat. Biotechnol.* 19: 162-166.
- Krishnamurthy, K., Balconi, C., Sherwood, J. E. and Giroux, M. J. (2001). Wheat puroindolines enhance fungal disease resistance in transgenic rice. *Mol. Plant Microbe In.* 14: 1255-1260.
- Kulberg, S, Storset, A. K., Heringstad, B. and Larsen, H. J. (2002). Reduced levels of total leukocytes and neutrophils in Norwegian cattle selected for decreased mastitis incidence. *J. Dairy Sci.* 85(12): 3470-3475.
- Kulberg, S., Heringstad, B., Gutttersrud, O. A. and Olsaker, I (2007). Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cows. *J. Anim. Breed. Genet.* 124(4): 201-207.
- Lahouassa, H., Moussay, E., Rainard, P. and Riollot, C (2007). Differential cytokine and chemokine responses of bovine mammary epithelial cells to *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Cytokine.* 38(1): 12-21.
- Lee, N., Kawai, K., Nakamura, I., Tanaka, T., Kumura, H. and Shimazaki, K. (2004). Susceptibilities against bovine lactoferrin with microorganism s isolated from mastitic milk. *J. Vet. Med. Sci.* 66(10): 1267-1269.
- Lemaitre, B. (1999). La drosophile: un modèle pour l'étude de la reponse immunitaire innée. *Médecine/Science.* 15.
- Lillemo, M. and Morris C. F. (2000). A leucine to proline mutation in puroindoline b is frequently present in hard wheats from Northern Europe. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1100-1107.
- Llanos, P., Henriquez, M., Minic, J., Elmorjani, K., Marion, D., Riquelme, G., Molgo, J. and Benoit, E. (2006). Puroindoline-a and alpha1-purothionin form ion channels in giant liposomes but exert different toxic actions on murine cells. *FEBS J.* 273: 1710-22.
- Maga, E. A., Cullor, J. S., Smith, W., Anderson, G. B. and Murray, J. D. (2006). Human lysozyme expressed in the mammary gland of transgenic dairy goats can inhibit the growth of bacteria that cause mastitis and the cold-spoilage of milk. *Foodborne Pathog. Dis.* 3(4): 384-392.
- Marion, D., Gautier, M. F., Joudrier, P., Ptak, M., Pezolet, M., Forest, M., Clark, D. C. and Broekaert, W. (1994). In processing of the wheat kernel proteins—molecular and functional aspects. 175-180.
- Martineau, F., Picard, F. J., Roy, P. H., Ouellette, M. and Bergeron, M. G. (1996). Species-specific and ubiquitous DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *J. Clin. Microbiol.* 34(12): 2888-93.
- Mattei, C., Elmorjani, K., Molgò, J., Marion, D. and Benoit, E. (1998). The wheat proteins puroindoline-a and α 1-purothionin induce nodal swelling in myelinated axons. *Neuro. Report.* 17: 3803-3807.

- Mauriello, G., De Luca, E., La Stora, A., Villani, F. and Ercolini, D. (2005). Antimicrobial activity of a nisin-activated plastic film for food packaging. *Letters in Applied Microbiology*. 41: 464-469.
- Merle, R., Schroder, A. and Hamann, J. (2007). Cell function in the bovine mammary gland: a preliminary study on interdependence of healthy and infected udder quarters. 74(2): 174-179.
- Morono, Y., Takano, S., Miyanaga, K., Tanji, Y., Unno, H. and Hori, K. (2004). Application of glutaraldehyde for the staining of esterase-active cells with carboxyfluorescein diacetate. *Biotechnol. Lett.* 26: 379-383.
- Morris, C. F. (2002). Puroindolines: the molecular genetic basis of wheat grain hardness. *Plant Mol. Biol.* 48: 633-647.
- Moy, T. I., Ball, A. R., Anklesaria, Z., Casadei, G., Lewis, K. and Ausubel, F. M. (2006). Identification of novel antimicrobials using a liveanimal infection model. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103: 10414-19.
- Nagahata, H., Ito, H., Maruta, H., Nishikawa, Y., Susukino, H., Matsuki, S., Higuchi, H., Okuhira, T. and Anri, A., (2007). Controlling Highly Prevalent *Staphylococcus aureus* Mastitis from the Dairy Farm. *J. Vet. Med. Sci.* 69(9): 893–898.
- Nicolas, P. and Mor, A. (1995). Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu. Rev. Microbiol.* 49: 277-304.
- Nilsson, J., Stahl, S., Lundberg, J., Uhlen, M. and Nygren, P. A. (1997). Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* 11: 1-16.
- Oda, S. and Schofield, J. D. (1997). Characterisation of friabilin polypeptides. *Journal of Cereal Science*. 26: 29-36.
- Oren, Z., and Y. Shai, (1998). Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*; 47: 451-463.
- Palliser, D., Chowdhury, D., Wang, Q. Y., Lee, S. J., Bronson, R. T., Knipe, D. M., and Lieberman, J. (2006). An siRNA-based microbicide protects mice from lethal herpes simplex virus 2 infection. *Nature*. 439: 89-94.
- Park, C.B., Kim, H. S. and Kim, S.C. (1998). Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244: 253-257.
- Petrykat, A. and Douglas, S. (2003). Gone gene fishing: how to catch novel marine antimicrobials. *TRENDS Biotechnol.* 21: 362-9.
- Philpot, W. N. (2002). A backward glance - A forward look. *National Mastitis Council Annual Meeting Proceedings*. 144–155.
- Remick, D. G., Bolgos, G. R., Siddiqui, J., Shin, J. and Nemzek, J. A. (2002). Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock*. 17: 463-7.
- Ricci, A., Vio, D. and Zavagnin, P (2003). Monitoraggio dell' antibioticoresistenza in batteri zoonotici e commensali isolati da bovini al momento della macellazione. *Atti della Società Italiana di Buiatria*. 35: 59-66.
- Rinaldi, A. C., Mangoni, M. L., Rufo, A., Luzi, C., Barra, D., Zhao, H., Kinnunen, P. K., Bozzi, A., Di Giulio, A. and Simmaco, M. (2002). Temporin L: antimicrobial, haemolytic and cytotoxic activities, and effects on membrane permeabilization in lipid vesicles. *Biochem. J.* 368: 91-100.
- Scaglione, F. and Rossoni, G. (1998). Comparative anti-inflammatory effects of roxithromycin, azithromycin and clarithromycin. *J Antimicrob Chemother.* 41: 47-50.

- Schukken, Y. H., Barkema, H. W. and Lam, T. J. G. M. (1998). Udder health programs: Present state and future perspectives. Proc. XX World Buiatrics Cong. 1: 225-229.
- Sørensen, H. P. and Mortensen, K. K., (2005). Advances genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Journal of Biotechnology. 115: 113-128.
- Serna, A., Maitz, M., O'Connell, T., Santandrea, G., Thevissen, K., Tienens, K., Hueros, G., Falieri, C., Cai, G., Lottspeich, F. and Thompson, R. (2001). Maize endosperm secretes a novel antifungal protein into adjacent maternal tissue. The Plant Journal. 25(6): 687-698.
- Sharma, B. S., Leyva, I., Schenkel, F. and Karrow, N. A (2006). Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. J. Dairy Sci. 89(9): 3626-3635.
- Shipkova, M., Niedmann, P. D., Armstrong, V. W., Oellerich, M. and Wieland, E. (2004). Determination of thiopurine methyltransferase activity in isolated human erythrocytes does not reflect putative in vivo enzyme inhibition by sulfasalazine. Clin. Chem. 50: 408-414.
- Sordillo, L. M., Snider, M., Hughes, H., Afseth, G., Campos, M. and Babiuk, L. A. (1991). Pathological changes in bovine mammary glands following intramammary infusion of recombinant interleukin-2. J. Dairy Sci. 74: 4164-4174.
- Sordillo, L. M. and Babiuk, L. A. (1991). Controlling acute *Escherichia coli* mastitis during the periparturient period with recombinant bovine interferon gamma. Vet. Microbiol. 28(2): 189-198.
- Spranger, J. (2000). Mastitis nicht verschleppen. Bioland. 1: 15-17.
- Steiner, H. (1981). Nature. 292: 246-248.
- Stevens, R. C., Yokoyama, S. and Wilson, I. A. (2001). Global efforts in structural genomics. Science. 294: 89-92.
- Studier, F. W. and Moffatt, B. A. (1986). Use of Bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. J. Mol. Biol. 189: 113-130.
- Thevissen, K., Osborn, R. W., Acland, D. P. and Broekaert, W. F. (2000). Specific binding sites for an antifungal plant defensin from *Dahlia* (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. Molecular Plant-Microbe Interactions. 13: 54-61.
- Todisco, T., FCCP, Tascini, C., Mezzasoma, L. and Eslami, A. (2002). Una b-defensina dell'epitelio bronchiale umano.
- Tompkins, W. A. (1999). Immunomodulation and therapeutic effects of the oral use of interferon- α : mechanism of action. J. Interferon Cytokine Res. 19: 817-828.
- Tossi, A. and Sandri, L. (2002). Molecular diversity in gene-encoded, cationic antimicrobial polypeptides. Current Pharmaceutical Design. 8: 743-761.
- Van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. Int J Antimicrobial Agents 2000; 14(4): 327-35.
- Vatta, S., Boniotto, M., Bevilacqua, E., Belgrano, A., Pirulli, D., Crivella, S. and Amoroso, A. (2000). Human beta defensin 1 gene: six new variants. Human Mutation. 15: 582-583.
- Wall, R. J., Powell, A. M., Paape, M. J., Kerr, D. E., Bannerman, D. D., Pursel, V. G., Wells, K. D., Talbot, N. and Hawk, H. W (2005). Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. Nat. Biotechnol. 23(7) :897-903.

Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.

6. TABELLE

TABELLA 1. Sistemi di espressione utilizzati per le puroindoline ricombinanti

Costrutto	Vettore	Promotore	Ceppo di <i>E.coli</i>	Prodotto
pET100:PINA	pET100/D-TOPO	T7	BL21 Star pLysS	Hys-PINA
pET100:PINB	pET100/D-TOPO	T7	BL21 Star pLysS	Hys-PINB
pGEX:PINA	pGEX-4T-3	Ptac	DH5 α ORIGAMI TM B	GST-PINA ORIA
pGEX:PINB	pGEX-4T-3	Ptac	DH5 α ORIGAMI TM B	GST-PINB ORIB

TABELLA 2. Oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione PCR dei geni delle puroindoline

Nome	Sequenza oligonucleotidica
Hys-PINA-for	5' <u>CACC</u> GATGTTGCTGGCG 3' ↓
Hys-PINA-rev	5' <u>TTA</u> GCCAATAGTGGCGGG 3' ↓ complem to overhang
Hys-PINB-for	5' <u>CACC</u> GAAGTTGGCGGAG 3' ↓ stop codon
Hys-PINB-rev	5' <u>CTA</u> CCAGTAATAGCCACTAG 3' ↓ complem to overhang
GST-PINA-for	5' <u>CG</u> <u>GAATTC</u> <u>C</u> <u>GGTGGTGGTGGTCCG</u> GATGTTGCTGGCGGGG 3' ↓ ↓ ↓ ↓ anchor EcoR1 frame linker region
GST-PINA-rev	5' <u>CCG</u> <u>CTCGAG</u> <u>TCA</u> GCCAATAGTGCCGGGGAT 3' ↓ ↓ ↓ anchor Xho1 stop codon
GST-PINB-for	5' <u>CG</u> <u>GAATTC</u> <u>C</u> <u>GGTGGTGGTGGTCCG</u> GAAGTTGGCGGAGGAG 3' ↓ ↓ ↓ ↓ anchor EcoR1 frame linker region
GST-PINB-rev	5' <u>CCG</u> <u>CTCGAG</u> TCACCAGTAATAGCCACTAG 3' ↓ ↓ anchor Xho1

TABELLA 3. Minima concentrazione delle PIN necessaria per inibire completamente la crescita batterica. I risultati sono rappresentati come la media \pm la deviazione standard.

Ceppo batterico	MIC ($\mu\text{g/ml}$) di PINA	MIC($\mu\text{g/ml}$) di PINB
<i>Escherichia coli</i>	30 ± 0.204	30 ± 0.316
<i>Staphylococcus aureus</i>	30 ± 0.408	30 ± 0.258
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ,	35 ± 0.816	35 ± 0.632
<i>Pseudomonas syringae phaseoli</i>	50 ± 0.689	50 ± 0.418
<i>Erwinia carotovora carotovora</i>	50 ± 0.258	50 ± 0.376
<i>Clavibacter michiganensis</i>	50 ± 0.491	50 ± 0.774

TABELLA 4. Attività inibitoria delle PIN contro *E. coli*. Ogni puroindolina è stata testata, a concentrazioni al di sotto del valore della MIC, da sola e combinata con concentrazioni subinibitorie dell'altra puroindolina. I risultati sono rappresentati dalla media \pm la deviazione standard.

Proteina inibitoria	Proteina subinibitoria (concentrazione)	% inibizione
PINA (1/3 MIC)		2 \pm 1.732
	PINB (1 μ g/ml)	14 \pm 0.764
	PINB (5 μ g/ml)	89 \pm 0.137
PINA (2/3 MIC)		84 \pm 1.312
	PINB (1 μ g/ml)	88 \pm 0.746
	PINB (5 μ g/ml)	90 \pm 1.061
PINB (1/3 MIC)		82 \pm 1.267
	PINA (1 μ g/ml)	82 \pm 0.606
	PINA (5 μ g/ml)	86 \pm 0.254
PINB (2/3 MIC)		89 \pm 0.732
	PINA (1 μ g/ml)	100 \pm 0.001
	PINA (5 μ g/ml)	100 \pm 0.001

TABELLA 5. Attività sinergica delle due puroindoline contro *Escherichia coli* e *Pseudomonas syringae phaseoli*. PINA e PINB sono state considerate alternativamente la proteina inibitoria e subinibitoria ed è stato calcolata la diminuzione del valore della MIC alle diverse combinazioni di PIN. I risultati sono rappresentati dalla media \pm la deviazione standard.

Ceppo batterico	Proteina inibitoria	Proteina subinibitoria (concentrazione)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Escherichia coli</i>	PINA		30 \pm 0.204
		PINB (1 $\mu\text{g/ml}$)	30 \pm 0.376
		PINB (5 $\mu\text{g/ml}$)	22 \pm 0.355
	PINB		30 \pm 0.316
		PINA (1 $\mu\text{g/ml}$)	20 \pm 0.664
		PINA (5 $\mu\text{g/ml}$)	12 \pm 0.326
<i>Pseudomonas syringae phaseoli</i>	PINA		50 \pm 0.689
		PINB (1 $\mu\text{g/ml}$)	45 \pm 0.535
		PINB (5 $\mu\text{g/ml}$)	35 \pm 0.098
	PINB		50 \pm 0.418
		PINA (1 $\mu\text{g/ml}$)	30 \pm 0.204
		PINA (5 $\mu\text{g/ml}$)	20 \pm 0.641

TABELLA 6. Attività antimicrobica delle puroindoline ricombinanti (rPIN). I risultati rappresentano una media di 6 repliche.

	rPINA ($\mu\text{g/ml}$)		rPINB ($\mu\text{g/ml}$)	
	MIC	MBC	MIC	MBC
Ceppo batterico				
<i>Escherichia coli</i>	30	300	30	300
<i>Staphylococcus aureus</i>	30	300	30	300

TABELLA 7. Produzione di nitriti in linee cellulari di monoliti-macrofagi murini J774 per 24, 48 e 72 ore con: rPINA, rPINB ed LPS. I risultati sono espressi come la media \pm la deviazione standard di 6 esperimenti condotti in triplicato.

Trattamento	Tempo di incubazione (ore)		
	24	48	72
Nessun trattamento	0.25 \pm 0.02	0.70 \pm 0.09	1.40 \pm 0.08
LPS 1 μ g/ml	1.94 \pm 0.11	38.20 \pm 4.20	34.80 \pm 2.90
rPINA 10 μ g/ml	3.44 \pm 0.41	2.80 \pm 0.36	2.92 \pm 0.53
rPINA 37.5 μ g/ml	2.50 \pm 0.13	2.75 \pm 0.27	3.08 \pm 0.24
rPINA 75 μ g/ml	2.62 \pm 0.21	2.81 \pm 0.40	2.97 \pm 0.33
rPINA 150 μ g/ml	4.88 \pm 0.62	3.18 \pm 0.48	2.60 \pm 0.17
rPINB 2 μ g/ml	4.50 \pm 0.60	3.20 \pm 0.51	3.39 \pm 0.60
rPINB 12.5 μ g/ml	3.19 \pm 0.34	3.17 \pm 0.57	3.88 \pm 0.87
rPINB 25 μ g/ml	3.06 \pm 0.42	2.56 \pm 0.37	4.05 \pm 0.62
rPINB 50 μ g/ml	4.56 \pm 0.58	5.06 \pm 0.45	5.00 \pm 0.25

TABELLA 8. Livello della proteina C reattiva nel plasma di topi trattati e di controllo prima e dopo l'infezione con *S. aureus*. I risultati sono espressi come la media \pm la deviazione standard.

	Proteina C reattiva ($\mu\text{g/ml}$)			
	Nessun trattamento	Infezione con <i>S.</i> <i>aureus</i>	Trattamento con rPINA	Trattamento con rPINB
Giorno -1	19.5 \pm 3.7	19.5 \pm 3.7	17.6 \pm 2.2	18.5 \pm 1.7
Giorno 1		48.2 \pm 3.9	26.6 \pm 4.1	22.3 \pm 2.1
Giorno 3		29.1 \pm 2.1	20.7 \pm 1.4	20.2 \pm 1.2
Giorno 5		26.3 \pm 1.5	21.2 \pm 1.8	18.7 \pm 1.4

TABELLA 9. Livello di fibrinogeno nel plasma di topi trattati e di controllo prima e dopo l'infezione con *S. aureus*. I risultati sono espressi come la media \pm la deviazione standard.

	Fibrinogeno (g/l)			
	Nessuno trattamento	Infezione con <i>S.</i> <i>aureus</i>	Trattamento con rPINA	Trattamento con rPINB
Giorno -1	1.43 \pm 0.33	1.43 \pm 0.33	1.32 \pm 0.18	1.33 \pm 0.31
Giorno 1		5.30 \pm 0.21	2.07 \pm 0.33	1.64 \pm 0.35
Giorno 3		2.77 \pm 0.43	1.84 \pm 0.31	1.56 \pm 0.24
Giorno 5		2.89 \pm 0.51	1.38 \pm 0.37	1.28 \pm 0.42

7. FIGURE

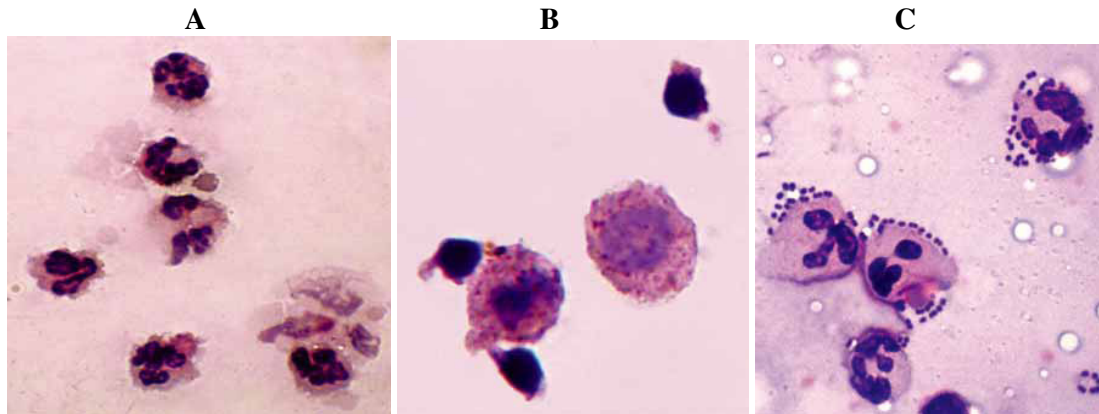


FIGURA 1. (A) Leucociti polimorfonucleati neutrofili del latte. (B) Linfociti (cellule blu scuro) e macrofagi (cellule grandi) isolati dal latte bovino. (C) Leucociti polimorfonucleati neutrofili del latte che fagocitano cellule batteriche



FIGURA 2. Struttura tridimensionale delle puroindoline: quattro alfa eliche connesse con cappellos flessibili.

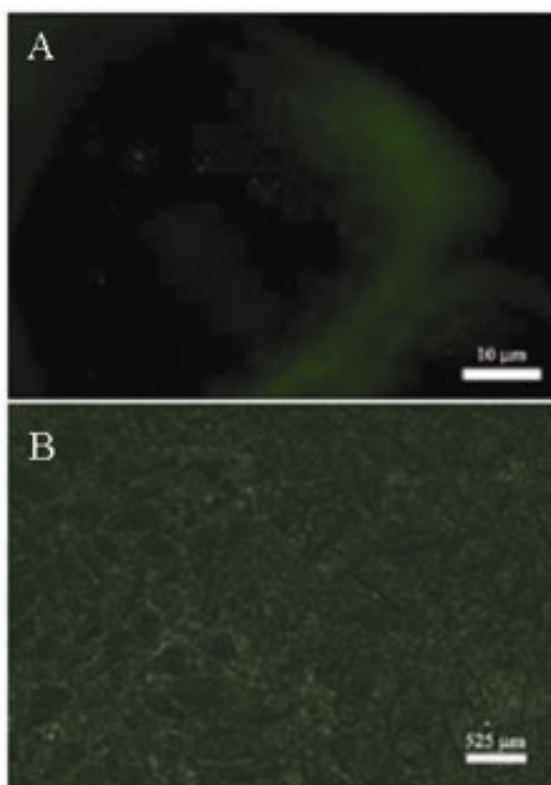


FIGURA 3. Controlli utilizzati per valutare la specificità degli anticorpi. (A) Sezione della cultivar soft Bilancia marcata con siero di ratto preimmune al posto dell'anticorpo primario. (B) Cultivar Sibilla PINA nulla incubata con gli anticorpi Rat α PINA/G α Rat^{FITC466}.

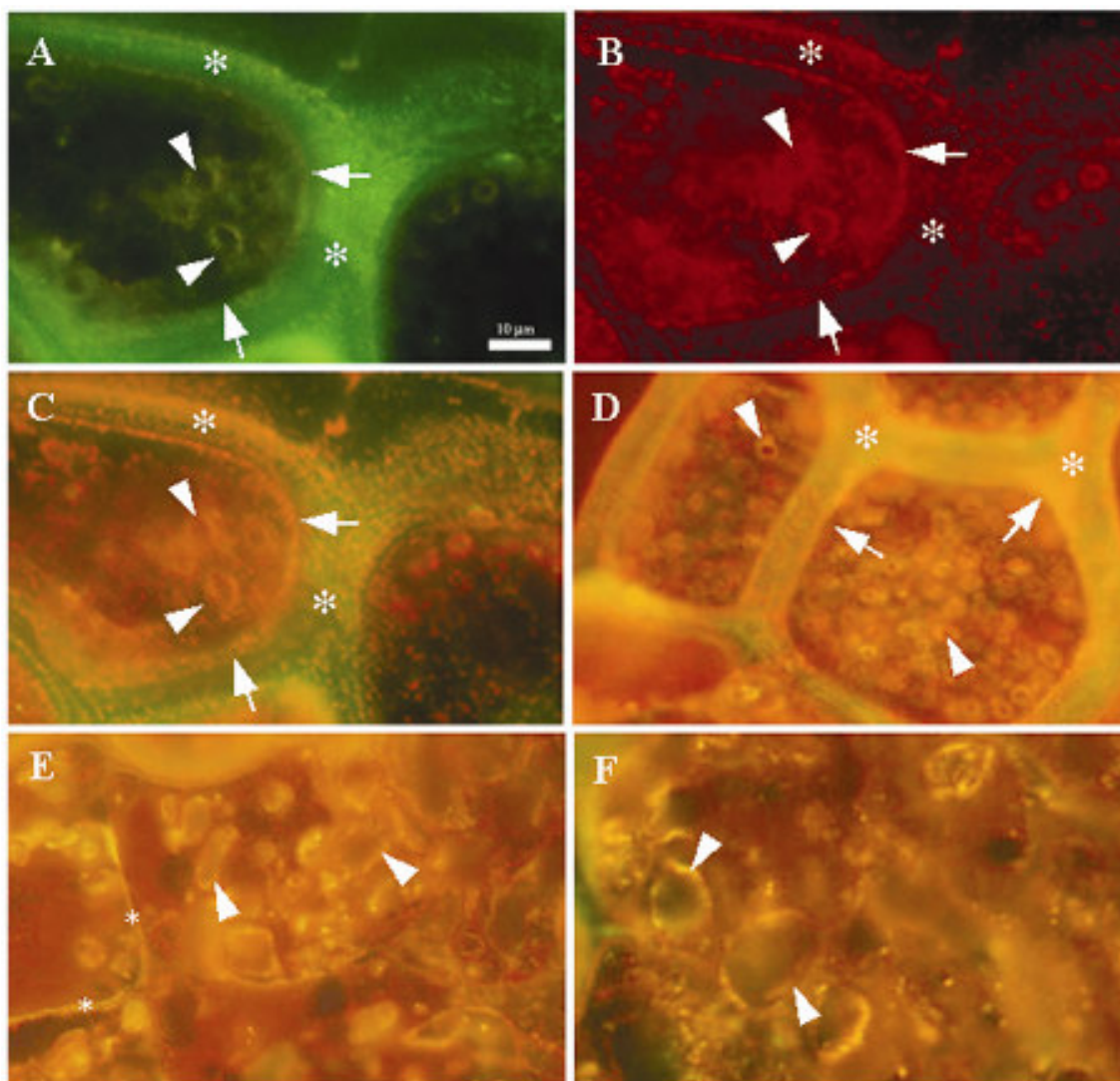


FIGURA 4. Immagine ottenuta a seguito di immunolocalizzazione di PINA e PINB su sezioni di cariossidi della cultivar soft Bilancia. (A) Micrografia fluorescente delle cellule dell'aleurone marcate con Rat α PINA/G α Rat^{FITC466} per l'immunolocalizzazione di PINA. Il campione è stato eccitato a 466 nm (verde); lo spettro di eccitazione è uguale a quello di emissione ed è compreso tra 450 e 517 nm. (B) Immagine fluorescente delle cellule dell'aleurone marcate con Rabbit α PINB/G α Rabbit^{Alexa594} per identificare PINB. Il campione è stato eccitato a 594 nm (rosso); lo spettro di eccitazione è compreso tra 519 e 600 nm, mentre quello di emissione è compreso fra 576 e 668 nm. (C) Sovrapposizione delle immagini A e B. I pixel arancioni stanno ad indicare la colocalizzazione delle due proteine (PINA e PINB). (D) Immagine rappresentante la colocalizzazione di PINA e PINB in un'altra sezione dello strato aleuronico. (E, F) Immagini sovrapposte che mostrano la localizzazione di PINA e PINB nell'endosperma. In tutte le immagini gli asterischi stanno ad indicare lo spazio intracellulare, le frecce indicano la membrana cellulare, le punte delle frecce indicano i granuli d'amido.

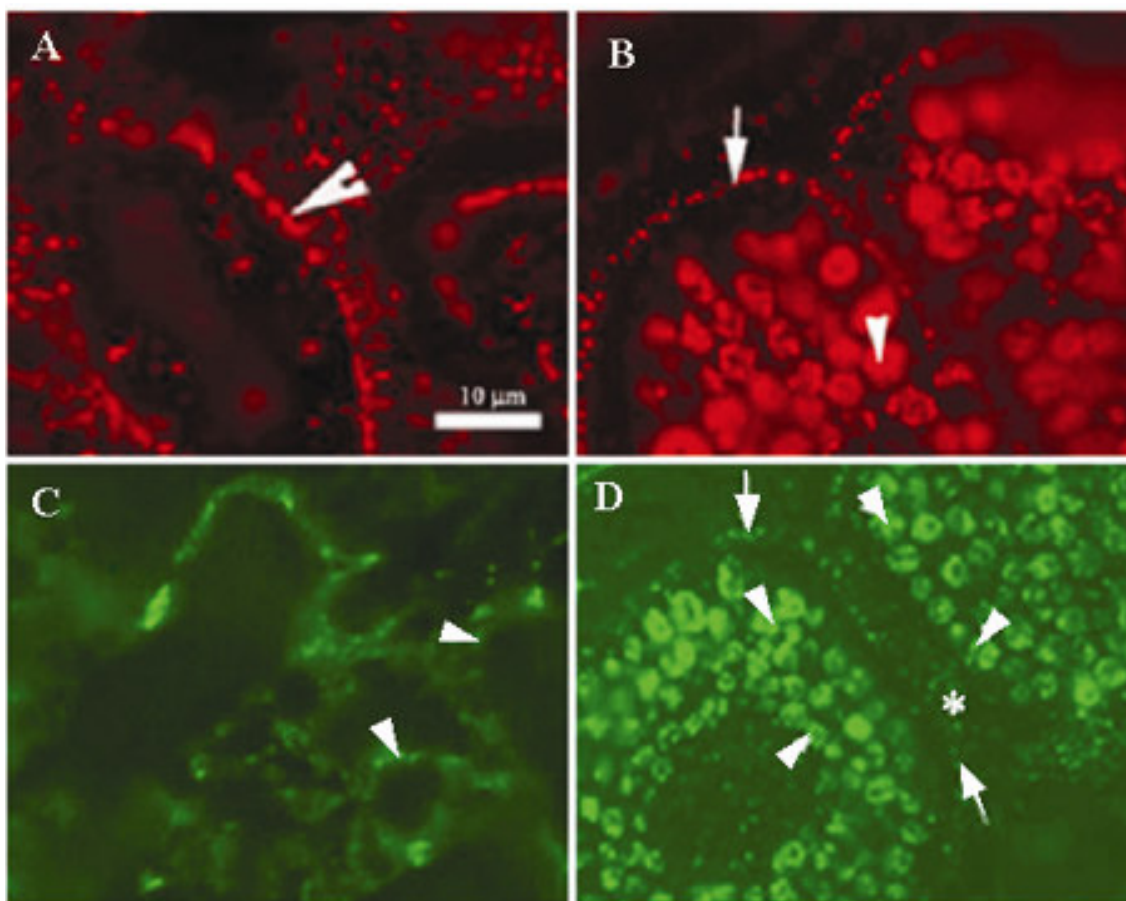


FIGURA 5. Immunolocalizzazione con anticorpi specifici per PINA e PINB su cariossidi di due cultivar che non esprimono rispettivamente PINA (Sibilla) e PINB (Canadian red). (A, B) Immunolocalizzazione eseguita su cariossidi della cultivar Sibilla: (A) accumulo di PINB (rosso) nelle cellule dello strato aleuronico, (B) accumulo di PINB nell'endosperma. (C, D) Immunolocalizzazione eseguita su cariossidi della cultivar Canadian red: (C) accumulo di PINA (verde) nelle cellule dello strato aleuronico, (B) accumulo di PINA nell'endosperma amilifero. Gli asterischi stanno ad indicare lo spazio intracellulare, le frecce indicano la membrana cellulare, le punte delle frecce indicano i granuli d'amido.

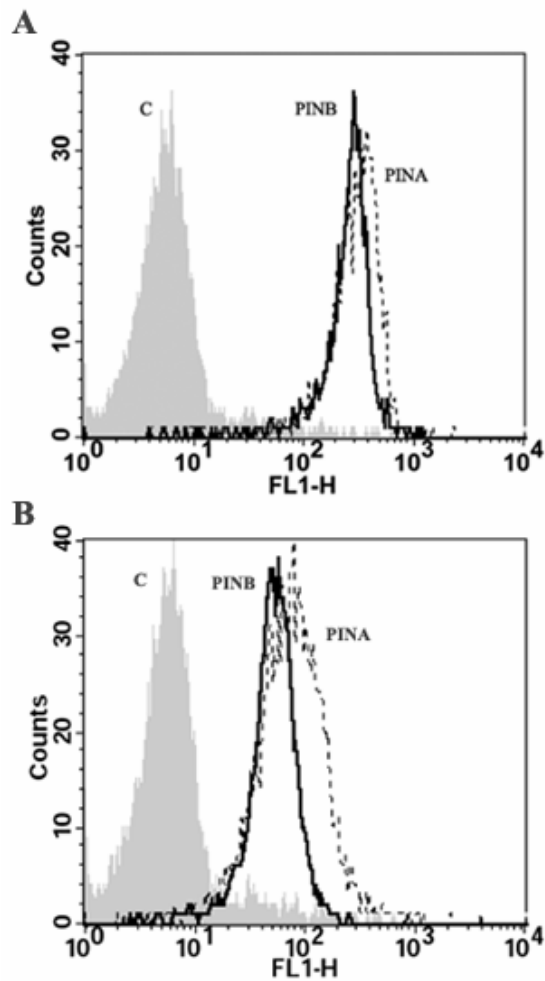


FIGURA 6. Identificazione citofluorimetrica delle PIN nelle preparazioni alimentari. Il quantitativo di PIN è espresso come mediana di fluorescenza (FL1-H). (A) Estratto proteico del biscotto Macina. (B) Estratto proteico di pane in cassetta. C = controllo (campione che non esprime le puroindoline: pane di frumento duro).

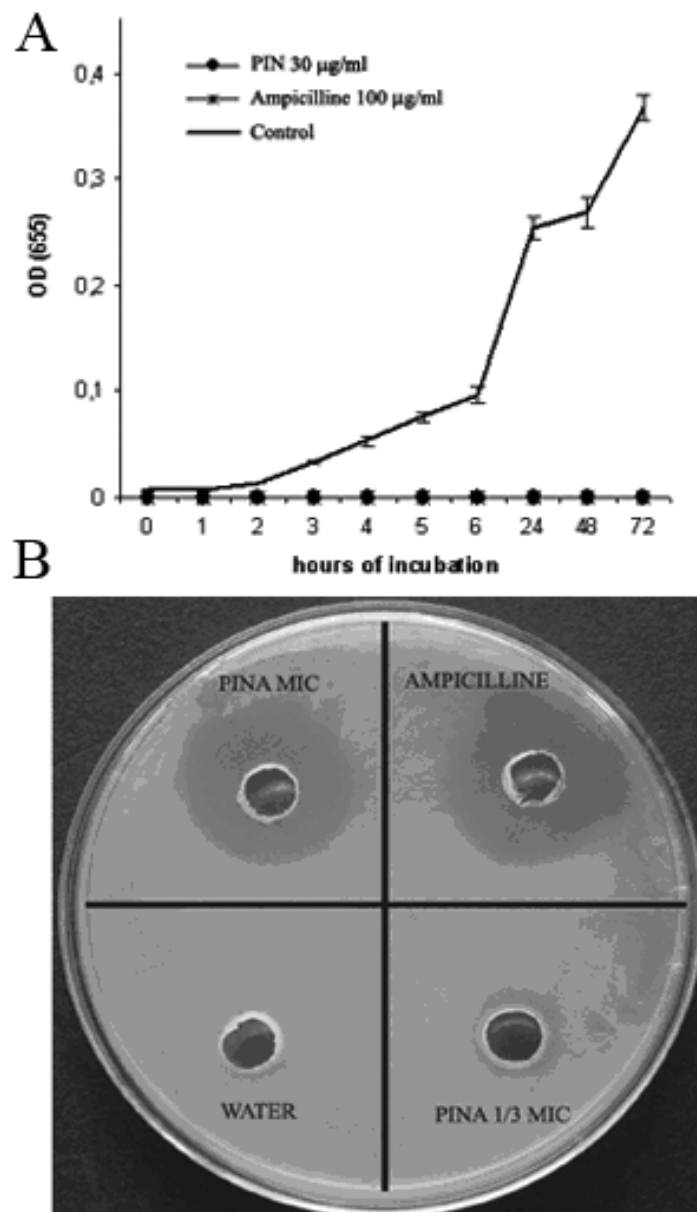


FIGURA 7. Attività antimicrobica di PINA su *E. coli*. (A) Killing-curve in funzione del tempo di *E. coli* utilizzando PINA al valore della MIC (30 µg/ml), PINA 10 volte il valore della MIC (300 µg/ml) e ampicillina (100 µg/ml). (B) Test dell'alone di inibizione: PINA al valore della MIC mostra un alone di inibizione comparabile a quello dell'antibiotico (2.22 cm e 2.33 cm rispettivamente).

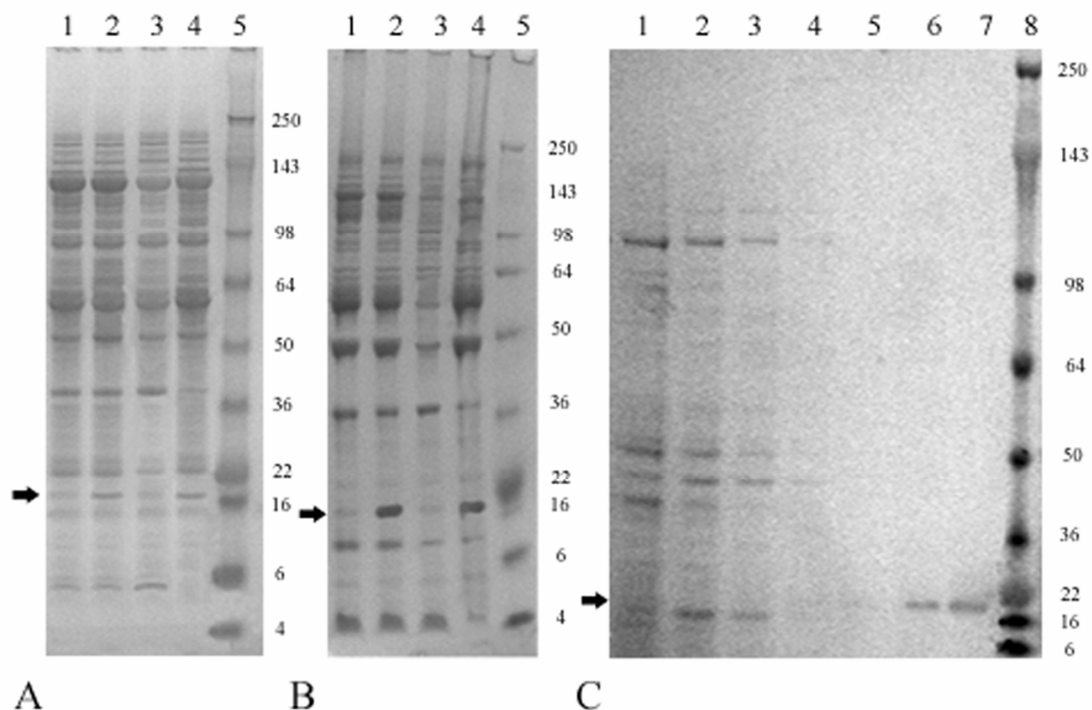


FIGURA 8. Espressione e purificazione delle Hys-PIN. (A) SDS-PAGE 4-12% (in Tris-Glicina) dell'espressione delle Hys-PIN nelle pLysS. Linea 1: campione non indotto, linea 2: campione indotto, linea 3: proteine solubili, linea 4: proteine insolubili, linea 5: marker SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen). (B) SDS-PAGE 4-12% (in Tris-Glicina) dell'espressione delle Hys-PIN nelle BL21*. Linea 1: campione non indotto, linea 2: campione indotto, linea 3: proteine solubili, linea 4: proteine insolubili, linea 5: marker SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen). (C) SDS-PAGE 4-12% (in Tris-Glicina) delle Hys-PIN espresse in BL21* e purificate per cromatografia d'affinità. Linea 1, 2: lavaggio a pH 7.2, linea 3-5: lavaggio a pH 6, linea 6,7: eluizione a pH 5.3, linea 8: marker SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen). Le frecce indicano le Hys-PIN.

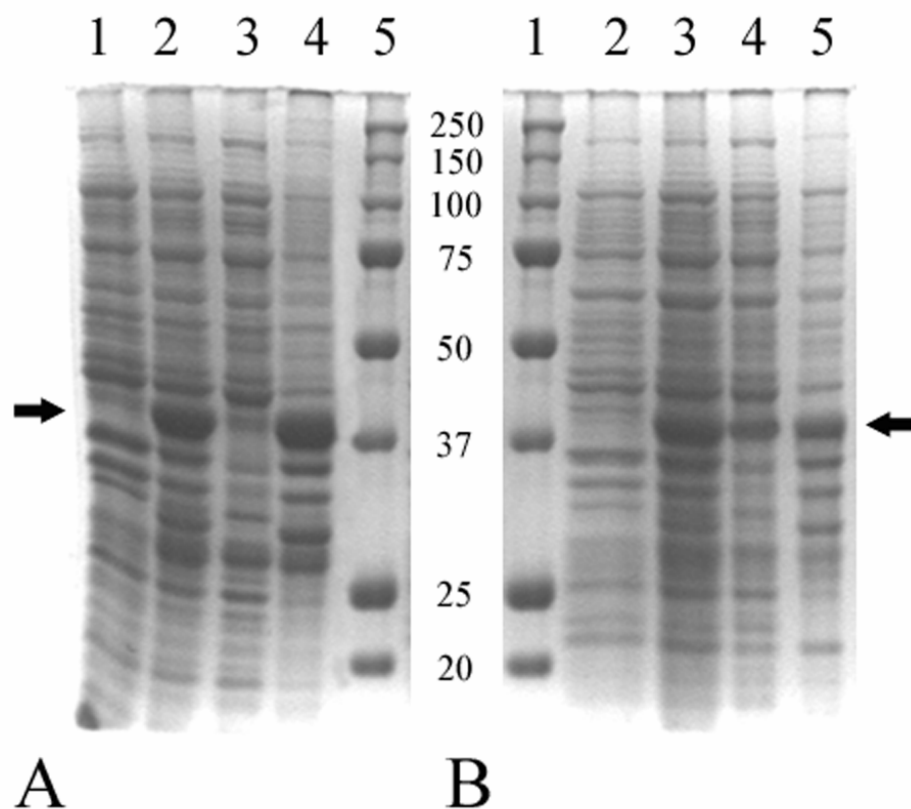


FIGURA 9. Espressione delle GST-PIN nelle DH5 α . (A) SDS-PAGE (4-10% in Tris-Glicina) dell'espressione delle GST-PIN a 37°C. Linea 1: campione non indotto, linea 2: campione indotto, linea 3: proteine solubili, linea 4: proteine insolubili, linea 5: marker Precision Plus protein standards (Biorad). (B) Espressione delle GST-PIN a 28°C. Linea 1: marker Precision Plus protein standards (Biorad), linea 2: campione non indotto, linea 3: campione indotto, linea 4: proteine solubili, linea 5: proteine insolubili. Le frecce indicano la GST-PIN.

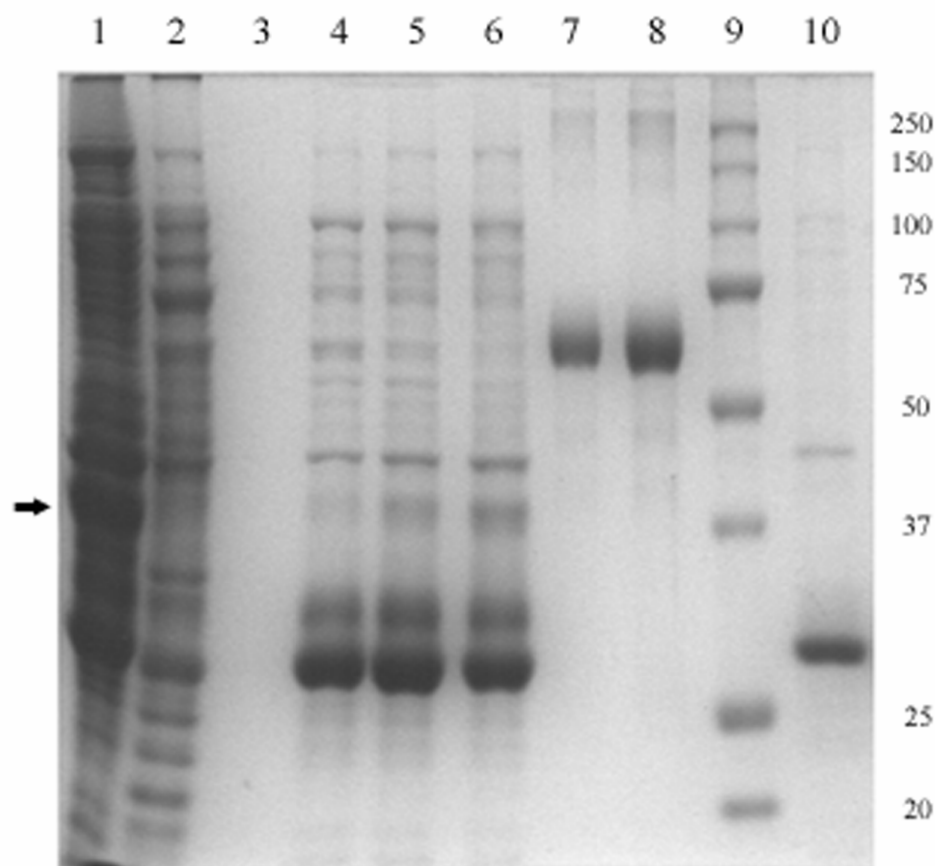


FIGURA 10. SDS-PAGE (4-10% in Tris-Glicina) della purificazione delle GST-PIN. Linea 1: campione legato alla resina, linea 2: campione non legato alla resina, linea 3: vuota, linea 4: campione eluito con tampone di eluizione (50mM Tris-HCl, 10mM glutathione ridotto, pH 8.0), linea 5: campione eluito con tampone di eluizione avente una concentrazione maggiore di glutathione (30mM), linea 6: campione eluito con tampone di eluizione con l'aggiunta di un detergente non ionico (0.1% Triton X-100), linee 7, 8: standard di BSA (1.5 µg/ml e 3 µg/ml rispettivamente), linea 9: marker Precision Plus protein standards (Biorad), linea 10: campione eluito con tampone di eluizione avente una maggiore forza ionica (100mM Tris-HCl). Le frecce indicano le GST-PIN.

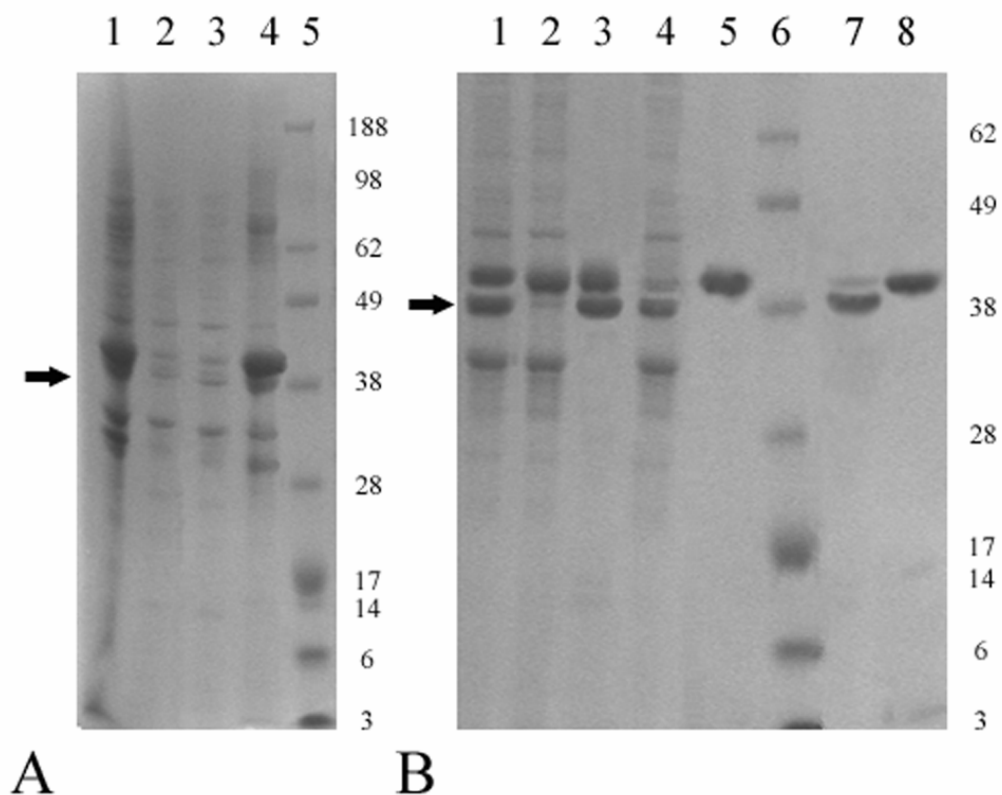


FIGURA 11. Solubilizzazione delle GST-PIN dai corpi di inclusione con differenti tamponi. (A) SDS-PAGE (4-12% in MES) della solubilizzazione delle GST-PIN con tampone Urea/Triton. Linea 1: proteine dei corpi di inclusione, linea 2: proteine solubilizzate dopo un'incubazione overnight, linea 3: proteine solubilizzate dopo 24 ore di incubazione, linea 4: proteine rimaste insolubili, linea 5: marker SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen). (B) SDS-PAGE (4-12% in MES) della solubilizzazione delle GST-PIN con tamponi Urea e GuHCl. Linea 1: proteine dei corpi di inclusione, linea 2: proteine solubilizzate dopo un overnight con Urea, linea 3: proteine rimaste insolubili, linea 4: proteine solubilizzate dopo un overnight con tampone GuHCl, linea 5: proteine rimaste insolubili, linea 6: marker SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen), linea 7: proteine solubilizzate dopo un trattamento prima con Urea 8M e poi con, linea 8: proteine rimaste insolubili. Le frecce indicano le GST-PIN.

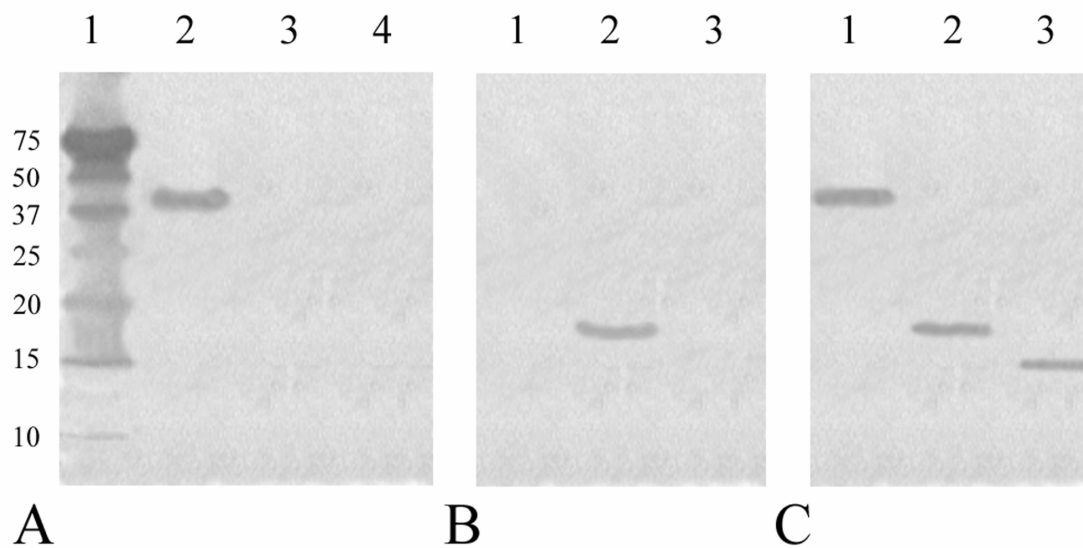


FIGURA 12. Risposta immune specifica generate nei confronti delle puroindoline ricombinanti. (A) Immunoblotting eseguito utilizzando Mouse α GST come anticorpo primario. Linea 1: marker Precision Plus protein standards (Biorad), linea 2: GST-PIN, linea 3: Hys-PIN, linea 4: puroindolina nativa. (B) Immunoblotting eseguito utilizzando Mouse α XPress come anticorpo primario. Linea 1: GST-PIN, linea 2: Hys-PIN, linea 3: puroindolina nativa. (C) Immunoblotting eseguito utilizzando Rat α PIN come anticorpo primario. Linea 1: GST-PIN, linea 2: Hys-PIN, linea 3: puroindolina nativa.

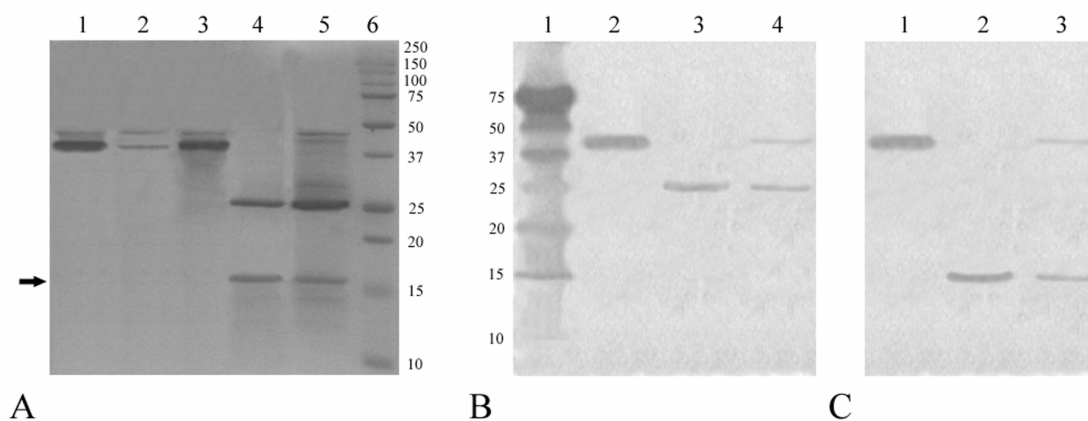


FIGURA 13. (A) SDS-PAGE (4-15% in Tris-glicina) delle GST-PIN refoldate e trattate con trombina. Linea 1: proteina refoldata, linea 2: proteina non foldata, linea 3: proteine refoldate legate alla resina Glutathione Sepharose 4B, linea 4: proteine tagliate dalla trombina ed eluite dalla resina, linea 5: proteine rimaste sulla resina dopo il taglio con la trombina, linea 6: marker Precision Plus protein standards (Biorad). Le frecce indicano la proteina tagliata. (B) Western immunoblotting eseguito utilizzando Mouse α GST come anticorpo primario. Linea 1: Marker Precision Plus protein standards (Biorad), linea 2: proteine refoldate legate alla resina Glutathione Sepharose 4B, linea 3: proteine tagliate dalla trombina ed eluite dalla resina, linea 4: proteine rimaste sulla resina dopo il taglio con la trombina. (C) Western immunoblotting eseguito utilizzando Rat α PIN come anticorpo, linea 1: proteine refoldate legate alla resina Glutathione Sepharose 4B, linea 2: proteine tagliate dalla trombina ed eluite dalla resina, linea 3: proteine rimaste sulla resina dopo il taglio con la trombina.

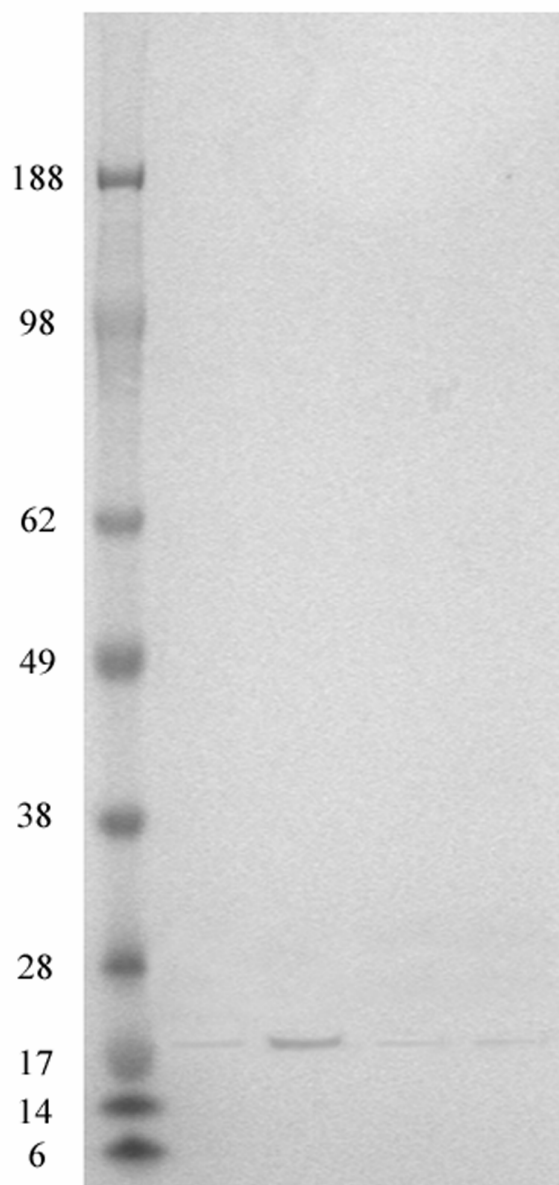


FIGURA 14. SDS-PAGE (4-12% in MES) delle Hys-PIN refoldate e trattate con enterochinasi. Linea 1: marker SeeBlue Plus2 Pre-Stained standard (Invitrogen), linea 2: proteine refoldate, linea 3: proteine non foldate, linea 4: Hys-PIN incubate con 1 unità di enterochinasi, linea 5: Hys-PIN incubate con 4 unità di enterochinasi.

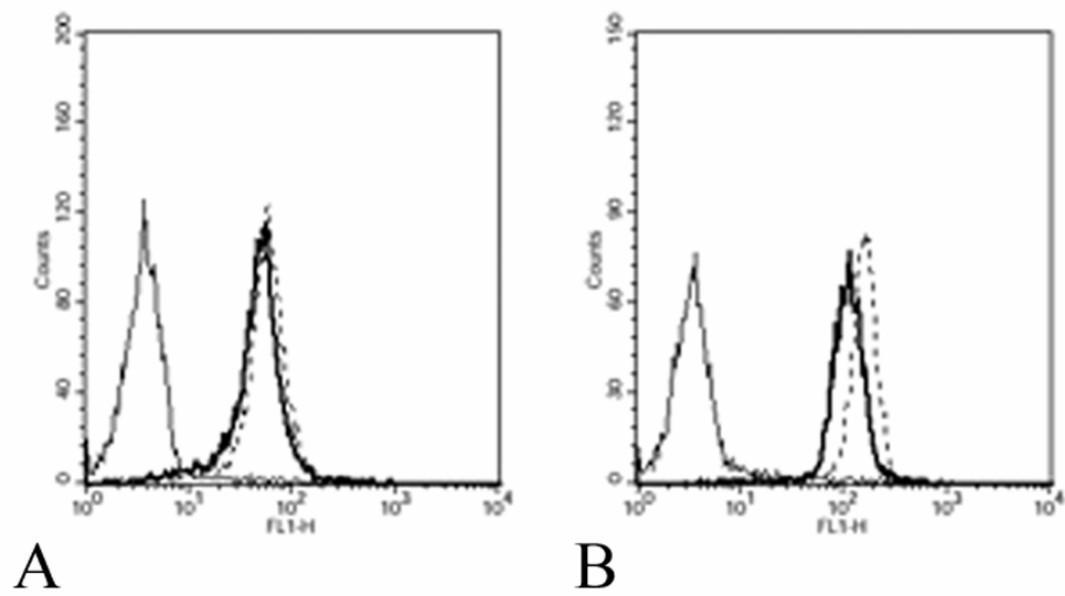


FIGURA 15. Profilo citofluorimetrico delle puroindoline native (linea continua) e ricombinanti (linea tratteggiata). (A) Rat α PIN utilizzato come anticorpo primario. (B) Rat α PIN utilizzato come anticorpo primario. I risultati sono rappresentati come mediana di fluorescenza (FL1-H).

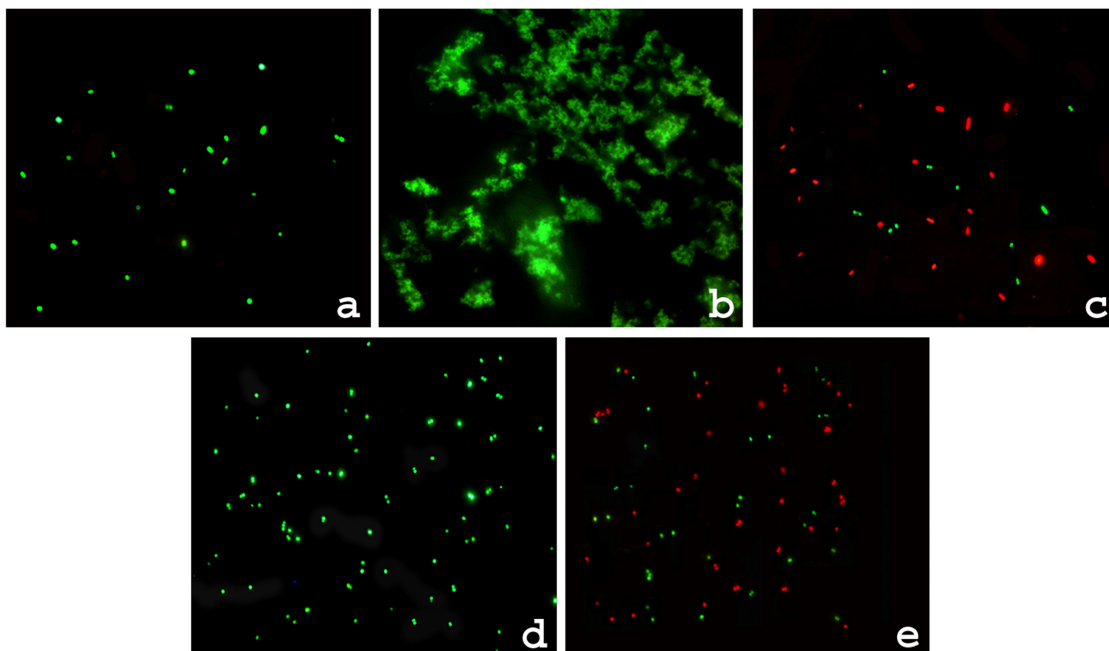


FIGURA 16. Marcatura della vitalità di *E. coli* e *S. epidermidis* trattati con le PIN. (A) cellule di *E. coli* non trattate utilizzate come controllo. (B) Debris cellulari osservati dopo incubazione di *E. coli* con alte concentrazioni di PINB ($1.25 \mu\text{g}/10^6$ batteri). (C) Cellule di *E. coli* vive e morte osservate in presenza di concentrazioni di PINB inferiori (10 volte minori). (D) cellule di *S. epidermidis* non trattate utilizzate come controllo. (E) Cellule di *S. epidermidis* vive e morte osservate in presenza di $5 \mu\text{g}$ di PINB/ 10^6 batteri.

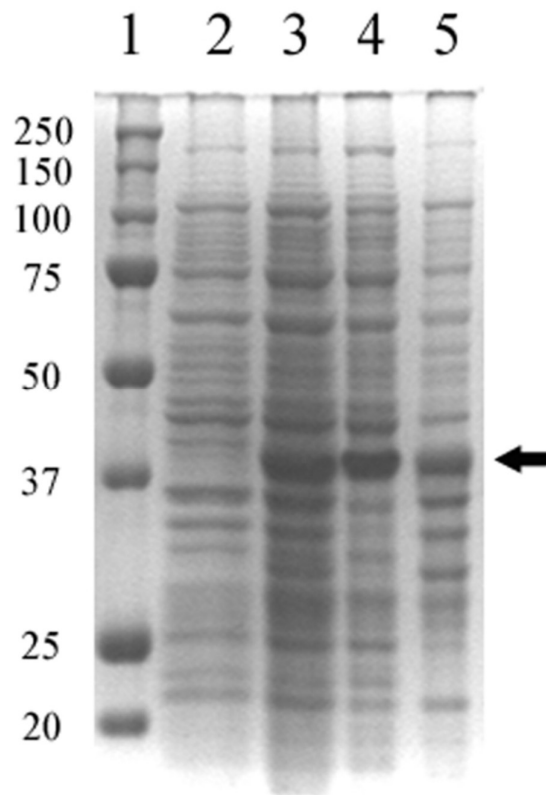


FIGURA 17. SDS-PAGE (4-12% in Tris-Glicina) dell'espressione di GST-ORIA nelle cellule di *E. coli* ORIGAM1 a 28 °C. Linea 1: marker Precision Plus protein standards (Biorad); linea 2: campione non indotto, linea 3: campione indotto, linea 4: proteine solubili, linea 5: proteine insolubili. Le frecce indicano GST-ORIA. L'SDS-PAGE di GST-ORIB ha dato un pattern di espressione molto simile.

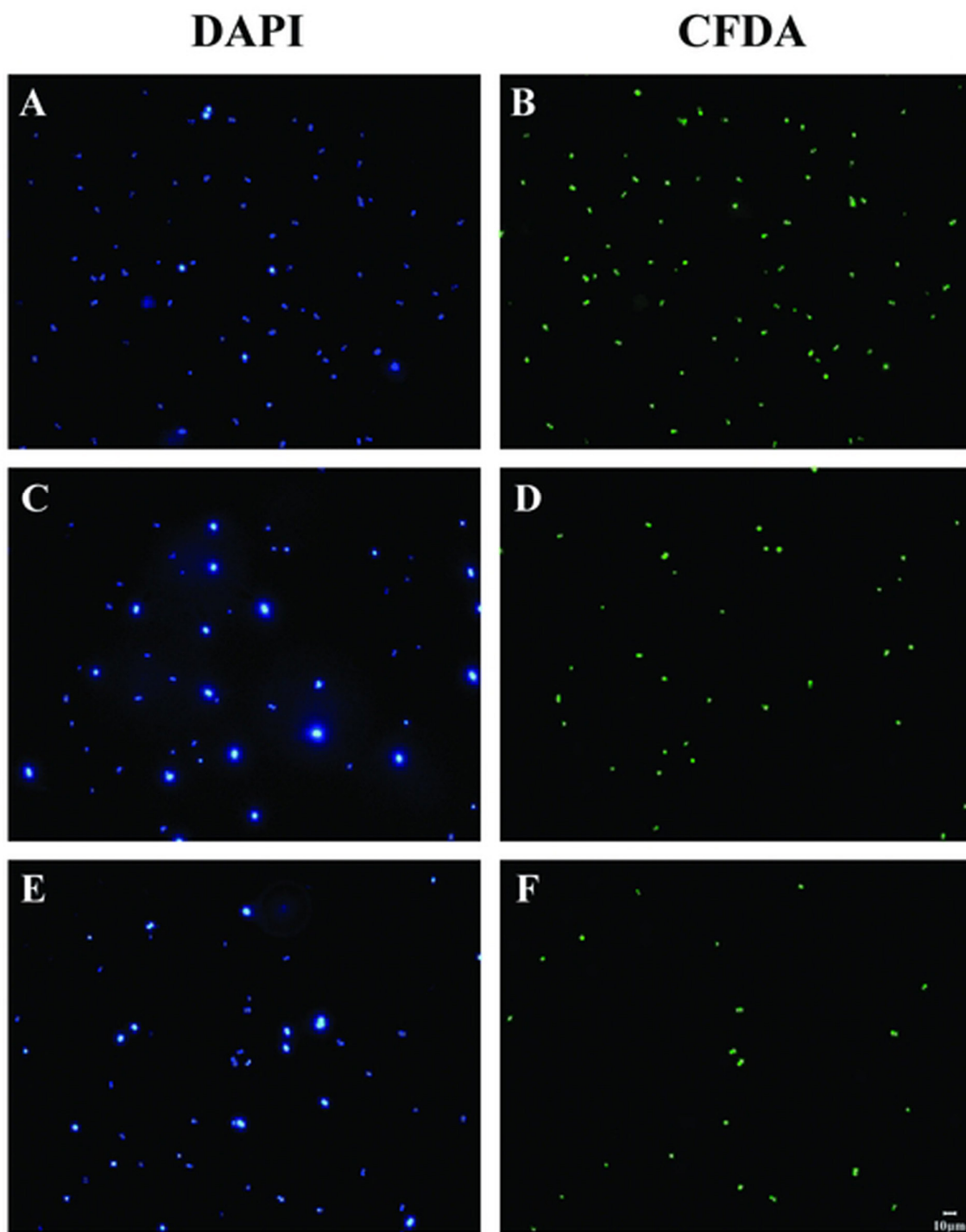


FIGURA 18. *S. epidermidis* doppiamente marcato con DAPI (che colora cellule vive e cellule morte – A, C e E) e CFDA (che colora solo le cellule vive – B, D e F). (A, B) Controllo (batteri non trattati); (C, D) batteri trattati con ORIA (40 µg/ml) e (E, F) con ORIB (40 µg/ml). I marcatori CFDA e DAPI sono stati visualizzati per eccitazione alla luce blu ed UV, rispettivamente.

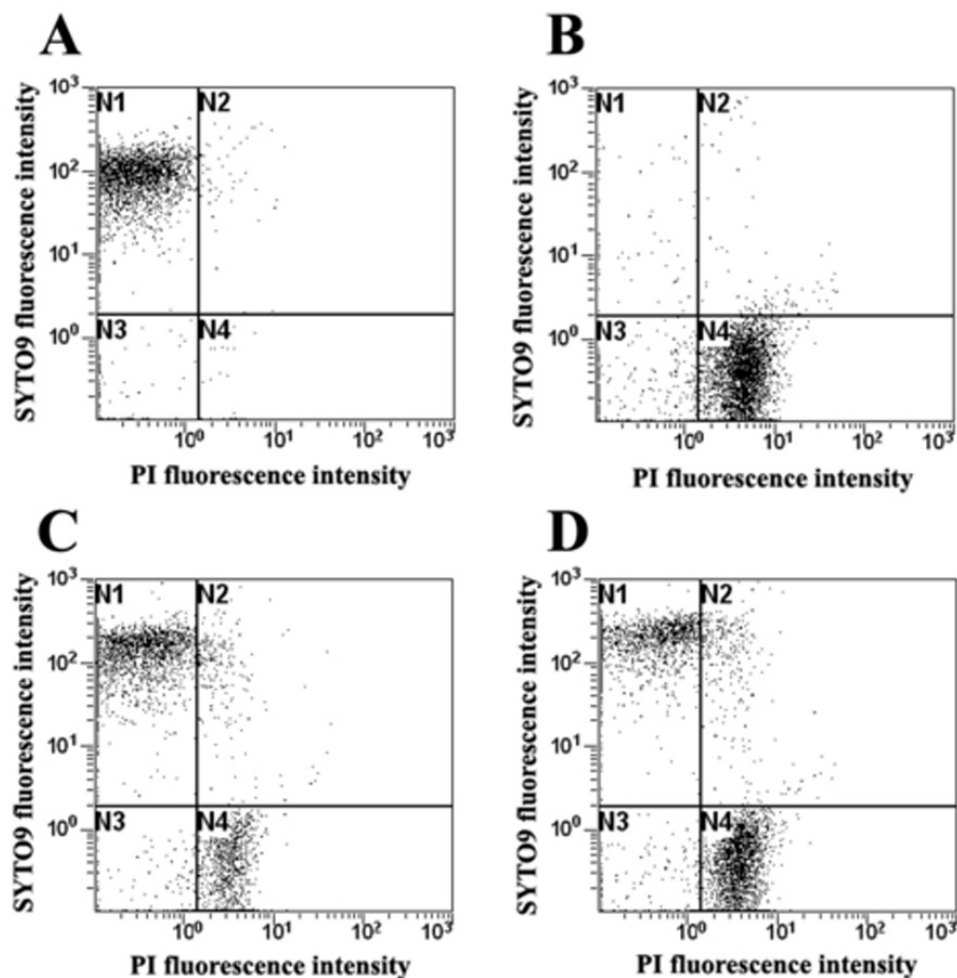


FIGURA 19. Citogramma a due parametri di 5000 eventi di una popolazione batterica di *S. epidermidis* trattata e non trattata con le puroindoline ricombinanti. (A) Batteri non trattati (controllo negativo); (B) batteri fissati in 70% isopropanolo (controllo positivo); (C) batteri trattati con ORIA (20 $\mu\text{g/ml}$); (D) batteri trattati con ORIB (20 $\mu\text{g/ml}$).

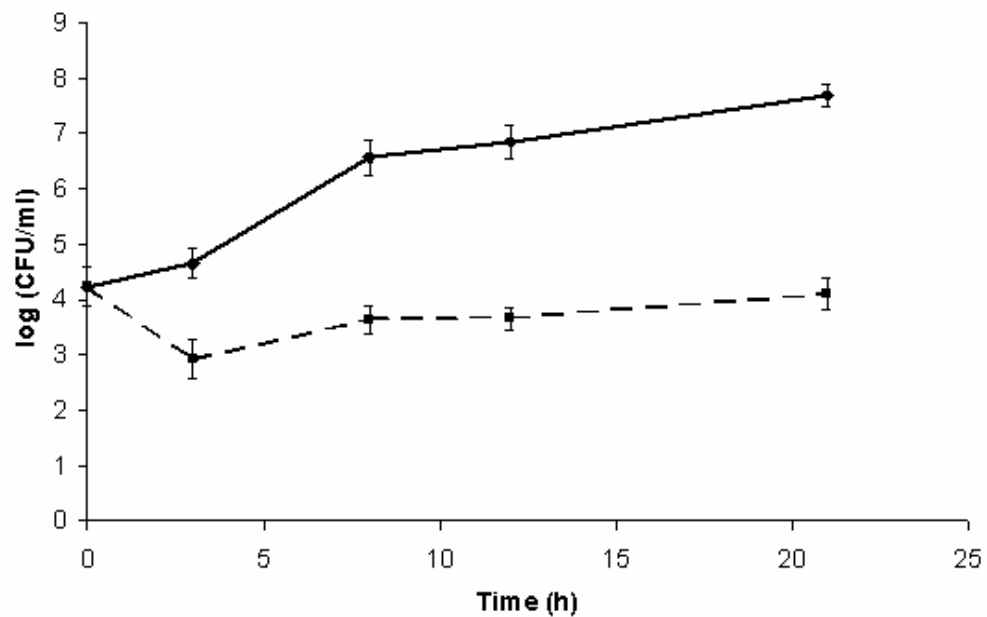


FIGURA 20. Conta in piastra di *S. epidermidis* intracellulare trattato (linea tratteggiata) o non trattato (linea continua) con ORIA (125 $\mu\text{g/ml}$). Le analisi sono state eseguite anche con ORIB (40 $\mu\text{g/ml}$), dando risultati comparabili.

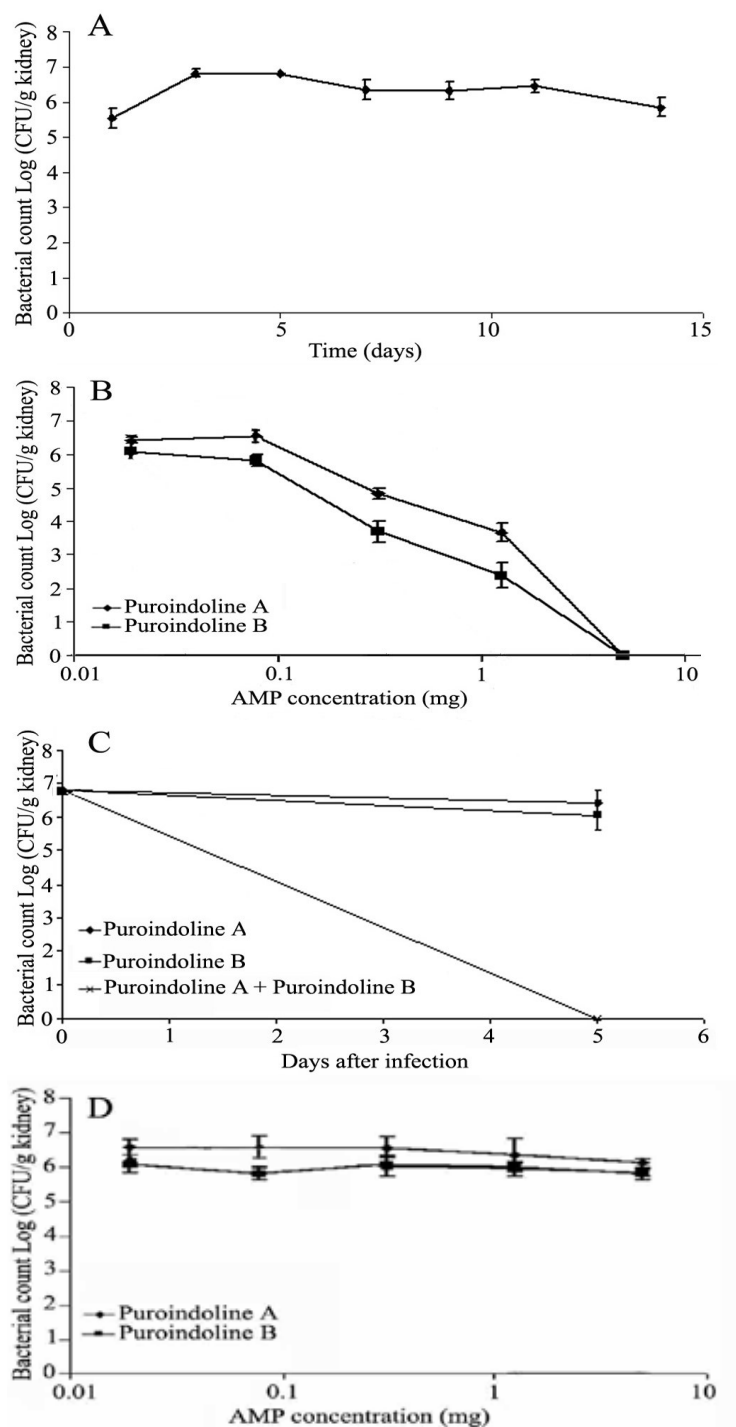


FIGURA 21. Livello di *S. aureus* nei reni (Log CFU/g) di animali infetti trattati o non trattati con le puroindoline ricombinanti. (A), topi non trattati con le puroindoline ricombinanti; (B), topi trattati con diverse dosi di rPINA o rPINB ricombinanti un giorno prima dell'infezione; (C), topi trattati con rPINA e rPINB, singolarmente o combinate, un giorno prima dell'infezione; (D), topi trattati con differenti concentrazioni di rPINA o rPINB somministrate quotidianamente per quattro giorni dopo l'infezione. I risultati rappresentano la media di tre esperimenti \pm la deviazione standard.

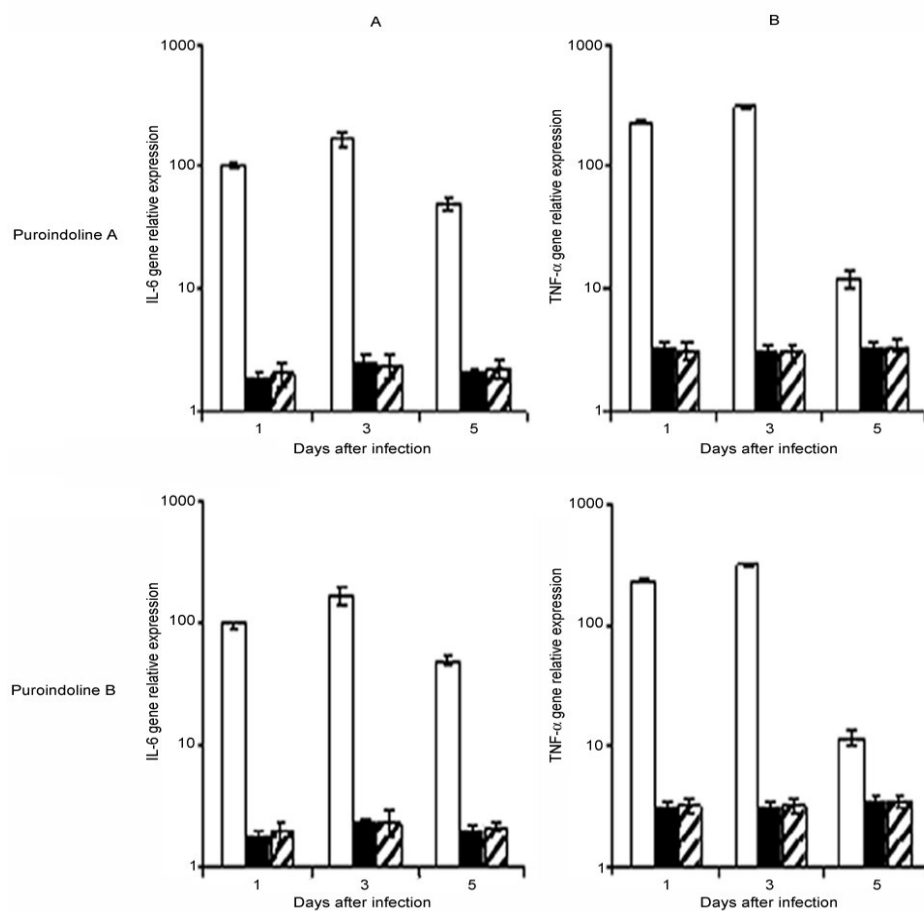


FIGURA 22: Livello di espressione nei reni di IL-6 (A) e TNF- α (B) in animali infettati con *S. aureus* ma non trattati (barra bianca); trattati con rPINA o rPINB ma non infetti (barra nera); infetti e trattati (barra a strisce). I risultati rappresentano la media di tre esperimenti \pm la deviazione standard.



FIGURA 23: Livello di espressione di CD25 nei reni di animali non trattati (barra bianca); infettati con *S. aureus* ma non trattati (barra nera), infetti e trattati con rPINA e rPINB. I risultati rappresentano la media di tre esperimenti \pm la deviazione standard.